

Hydroxyprolin gebundene Glykane  
der Zellwand von  
*Chlamydomonas reinhardtii*

Inaugural-Dissertation

zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Klaus Bollig aus Trier

2006

Berichterstatter: Prof. Dr. S. Waffenschmidt  
Prof. Dr. D. Schomburg

Tag der mündlichen Prüfung: 06.12.2006

Die vorgelegte Arbeit wurde in der Zeit vom Juni 2002 bis September 2006  
im Institut für Biochemie der Universität zu Köln unter Leitung von  
Frau Professor Dr. Sabine Waffenschmidt angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Waffenschmidt für das Thema dieser  
Arbeit Ihr ständiges Interesse und die vielen Diskussionen, die maßgeblich zum  
Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein weiterer Dank gilt Herr Dr. Schmickler vom Institut für Organische Chemie  
(Uni-Köln) für die sehr guten NMR-Messungen.

Herr Professor Dr. Marner und seiner Arbeitsgruppe am Institut für Biochemie  
(Uni-Köln) danke ich für die wertvolle Hilfe bei der Auswertung der gewonnenen  
NMR-Daten.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Dr. Schweimer vom Zentrum für Biopolymere  
der Universität Bayreuth für die Durchführung der NOESY-Messungen.





Für meine Eltern



# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1 Einleitung</b>	1
1.1 Hintergrund	1
1.2 Extensine höherer Pflanzen	3
1.3 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> – Ein Modellorganismus	6
1.4 Die Fortpflanzung von <i>Chlamydomonas</i>	7
1.5 Die Glykoproteine der <i>Chlamydomonas</i> Zellwand	9
1.6 Hydroxyprolin gebundene Glykane der Zellwand von <i>Chlamydomonas</i>	13
1.7 Zielsetzung	14
<b>2 Ergebnissteil</b>	15
2.1 Lineare Hydroxyprolin gebundene Glykane aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	15
2.1.1 Reinigung von HypGlykanen aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	15
2.1.2 ESI-MS-Analyse von HypGlykanen aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	18
2.1.3 Gaschromatographische Analyse der <i>Arabidopsis thaliana</i> Glykane	21
2.1.4 Methylierungsanalyse der <i>Arabidopsis thaliana</i> Glykane	22
2.1.5 NMR-Analysen der <i>Arabidopsis thaliana</i> Glykane	29
2.1.6 Zusammenfassung des Kapitels	34
2.2 Lineare Hydroxyprolin gebundene Glykane aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	36
2.2.1 Reinigung von HypGlykanen aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	36
2.2.2 HPLC-Trennung zur Gewinnung von Reinfractionen	42
2.2.3 Gaschromatographische Analyse der HPLC-Fractionen	45
2.2.4 Methylierungsanalyse der HPLC-Fractionen	46
2.2.5 NMR-Analyse präparativ gereinigter HypGlykane aus <i>Chlamydomonas</i>	53
2.2.6 Zusammenfassung des Kapitels	56
2.3 Analyse einer Gesamtpräparation Hydroxyprolin gebundener Glykane	58
2.3.1 Zusammenfassung des Kapitels	79
2.4 Hydroxyprolin gebundene Glykane aus <i>Chlamydomonas incerta</i>	80
2.4.1 Zusammenfassung des Kapitels	84
2.5 Glykosylierungsunterschiede im Zellzyklus von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	85
2.5.1 Zusammenfassung des Kapitels	94
<b>3 Diskussion</b>	95
3.1 Präparation Hydroxyprolin gebundener Glykane	95
3.2 Strukturelemente der HypGlykane aus <i>Arabidopsis</i> und <i>Chlamydomonas</i>	97
3.3 Galaktofuranosen der HypGlykane aus <i>Chlamydomonas</i>	98
3.4 Biosynthese linearer HypGlykane aus <i>Arabidopsis</i> und <i>Chlamydomonas</i>	101

	Seite
3.5 Größere Hydroxyprolin gebundene Glykane aus <i>Chlamydomonas</i>	103
3.6 Glykosylierungsunterschiede im Zellzyklus	106
3.7 Ausblick	108
<b>4 Methodischer Teil</b>	110
4.1 Reinigung von HypGlykanen aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	110
4.1.1 Algenstämme und Kulturbedingungen	112
4.1.2 Stammkulturen	113
4.1.3 Belüftungskulturen	113
4.1.4 Bestimmung der Zelldichte und der Wachstumsstadien	114
4.1.5 Präparation der perchloratlöslichen Zellwand	114
4.1.6 Aggregate der perchloratlöslichen Zellwand	115
4.1.7 Hydroxyprolin gebundene Glykane aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	115
4.1.8 Alkalische Hydrolyse der Glykoproteine mit Ba(OH) <sub>2</sub>	116
4.1.9 Reinigung der HypGlykane durch <i>Aminex</i> -Kationenaustauschchromatographie	117
4.1.9.1 <i>Aminex</i> -Chromatographie von HypGlykanen der PSW	118
4.1.9.2 <i>Aminex</i> -Chromatographie von HypGlykanen der zweiten Reinheitsstufe	119
4.1.10 Trennung von Hydroxyprolinglykosiden durch HPLC	120
4.2 Bestimmung des Hydroxyprolingehaltes nach Kivirikko	121
4.2.1 Hydroxyprolinbestimmung in großem Maßstab	121
4.2.2 Hydroxyprolinbestimmung in Mikrotiterplatten	121
4.3 ESI-Massenspektrometrie	122
4.3.1 Probenvorbereitung zur ESI-MS-Analyse	124
4.4 Gaschromatographische Analyse von Hydroxyprolin gebundenen Glykanen	124
4.5 Methylierungsanalyse Hydroxyprolin gebundener Glykane	126
4.5.1 Derivatisierungsprotokoll für die Methylierungsanalyse	129
4.5.2 Methodische Parameter bei der GC-MS-Analyse	132
4.6 Magnetische Kernresonanzspektrometrie	132
4.6.1 H-C-Cosy-Messungen	132
4.6.2 NOESY-Messungen	134
4.7 Allgemeine biochemische Arbeitsmethoden	135
4.7.1 Elektrophoretische Methoden	135
4.7.1.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	135
4.7.1.2 SDS-Minigelelektrophorese	137
4.7.1.3 Gelelektrophoretische Molekulargewichtsbestimmung	137
4.7.2 Qualitative Proteinbestimmung	138
4.7.2.1 Coomassie Blaufärbung	138
4.7.2.2 Silberfärbung	138

	Seite
4.7.3 Quantitative Proteinbestimmung	139
4.7.3.1 Mikro-Lowry	139
4.7.3.2 Mikro-Biuret	140
4.7.3.3 Coomassie-Blaustest	140
4.8 Chemikalien und Laborgeräte	140
4.8.1 Chemikalien	140
4.8.2 Laborgeräte	141
<b>5 Datenanhang</b>	142
5.1 ESI-MS-Analyse Hydroxyprolin gebundener Glykane	142
5.1.1 ESI-MS-Analyse von HypGlykanen aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	142
5.1.2 ESI-MS-Analyse von HypGlykanen aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	146
5.1.2.1 ESI-MS-Gesamtspektren	146
5.1.2.2 ESI-MS <sup>2</sup> -Stoßfragmentierungen	148
5.2 Methylierungsanalyse Hydroxyprolin gebundener Glykane	152
5.2.1 EI-Spektren der Cis-Hydroxyprolin gebundenen Glykane aus <i>Arabidopsis</i>	152
5.2.2 GC-MS-Analyse der HypGlykane aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	155
5.2.2.1 Gaschromatogramme	155
5.2.2.2 EI-Spektren identifizierter Zuckermonomere	159
5.3 Sonstige Datenanhänge	171
5.3.1 GC-Analyse der Reinfractionen aus Kapitel 2.2	171
5.3.2 Zusätzliche NMR-Analysen	172
<b>6 Verzeichnisse</b>	174
6.1 Literaturverzeichnis	174
6.2 Abbildungsverzeichnis	185
6.3 Tabellenverzeichnis	194
6.4 Abkürzungsverzeichnis	197
<b>7 Kurzzusammenfassung</b>	200
<b>8 Summary</b>	202



# 1 Einleitung

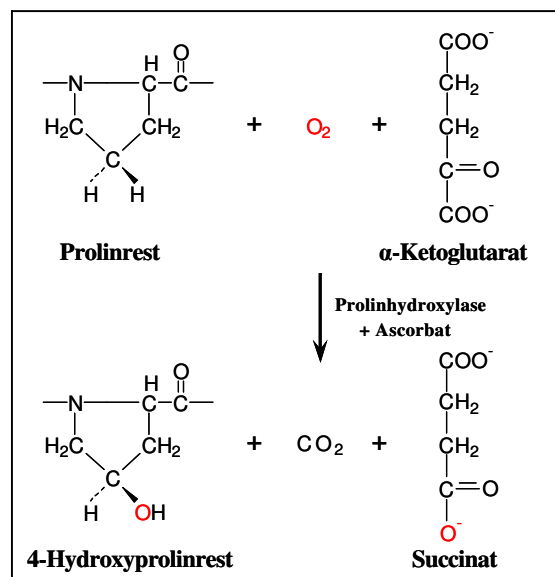
## 1.1 Hintergrund

Eine wichtige Grundvoraussetzung für die Entstehung von Leben ist, neben der Fähigkeit zur Reproduktion, die Ausbildung von Kompartimentierungsräumen und die damit verbundene Möglichkeit zur Erzeugung biologisch-chemischer Gradienten. Entwicklungsgeschichtlich betrachtet beginnt diese Kompartimentierung mit der Ausbildung micellenähnlicher Zell-Gebilde mit einfach strukturierten Zellmembranen. Mit der fortschreitenden, durch den selektiven Druck der Evolution getriebenen Entwicklung einfacher Organismen, bis hin zu komplexen mehr- oder vielzelligen Lebewesen, stieg gleichzeitig auch die Anzahl und Komplexität der an die zellumgrenzenden Strukturen gestellten Aufgaben. Es entstanden stabile Zellwände, die es einer Zelle grundsätzlich ermöglichen, auch extreme Lebensräume zu besiedeln.

Dabei gehen die Funktionen der Wandbestandteile weit über den Aspekt der Formgebung und Stabilität hinaus. Zellwände dienen gleichzeitig als Vermittler zwischen Zelle und Umgebung. Sie schützen den Organismus vor schädlichen äußeren Einflüssen oder dienen der koordinierten Interaktion bestimmter Zellen untereinander. Um diesen Anforderungen gerecht zu werden, besitzen Zellwände eine ganze Reihe verschiedenster Biomoleküle. Zu den wichtigsten Bestandteilen pflanzlicher Zellwände gehören hochpolymere Polysaccharide wie die Cellulose, aber auch eine Reihe von Proteinen, die die verschiedensten Aufgaben erfüllen.

Eine sehr weit verbreitete Superfamilie pflanzlicher Zellwandproteine sind die Hydroxyprolinreichen Glykoproteine (HRGPs). Zu ihnen gehören die Arabinogalaktanproteine, die durch die Gummi-Arabicum Proteine eine große Bedeutung erlangt haben. Eine zweite Familie der HRGPs sind die Extensine, die quer durch das Pflanzenreich in den Zellwänden einfacher Algen, aber auch in höheren Pflanzen wie Tabak oder Tomate zu finden sind. Die Lektine der Solanaceae bilden eine dritte Gruppe der HRGPs. Hierbei handelt es sich um chimäre Proteine, die sich aus Extensindomänen und hochbindungsspezifischen Lektindomänen zusammensetzen.

HRGPs kennzeichnen sich durch ihren hohen Gehalt an 4-Hydroxyprolin, das posttranslational modifiziert, O-glykosidisch verbundene Oligosaccharidseitenketten trägt. Eine weitere Gemeinsamkeit aller HRGPs ist das durch die Glykosylierung stabilisierte Sekundärstrukturelement der Proteine, die Polyprolin-II-Helix. Dieses, neben  $\alpha$ -Helix und  $\beta$ -Faltblatt häufigste Sekundärstrukturelement, wurde in der Natur gleich mehrfach verwirklicht. Tierische Kollagene zählen ebenfalls zu den Hydroxyprolinreichen Proteinen, sind aber im Gegensatz zu den HRGPs durch die Ausbildung einer triplehelikalen Konformation und nicht durch Glykosylierung stabilisiert. Eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung dieser Superstruktur spielt aber auch bei den Kollagenen die Hydroxylierung von Prolin zu Hydroxyprolin, da die resultierende Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen in wässriger Umgebung die Formierung einer Kollagen-Helix überhaupt erst ermöglicht [1,2]. Evolutiv betrachtet ergibt sich daher für beide Proteinklassen, den HRGPs und den Kollagenen, die Notwendigkeit einer Maschinerie zur Hydroxylierung von Prolin. Die Entstehung dieser Maschinerie ist dabei abhängig von einem relativ hohen Anteil an Sauerstoff, da es sich bei der Hydroxylierungsreaktion um einen direkt Sauerstoff abhängigen Prozess handelt (Abbildung 1).



**Abb. 1:** Hydroxylierung von Prolin.

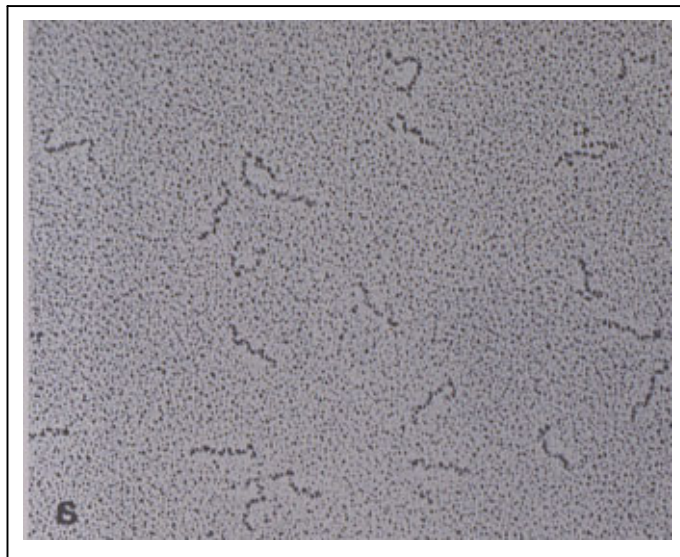
So wird heute davon ausgegangen, dass hydroxyprolinreiche Proteine erstmals im Präkambrium auftraten, zu jenem Zeitpunkt, als durch den zunehmenden Gehalt an Sauerstoff in der Atmosphäre, die Artenvielfalt deutlich anstieg [3].



Für die im Pflanzenreich weit verbreiteten HRGPs war zusätzlich die koevolutive Entwicklung einer O-Glykosylierungsmaschinerie erforderlich, die neben der Bereitstellung von Zuckereinheiten aus dem Zellstoffwechsel und neben den dazugehörigen Reaktionsräumen gleichzeitig auch eine ausreichende Anzahl verschiedener Glykosyltransferasen zur Verfügung stellte. Der Vorgang der O-Glykosylierung findet dabei posttranslational im Golgi-Apparat einer Zelle statt [4]. Es wird vermutet, dass die Synthese Hydroxyprolin gebundener Glykane Schritt für Schritt erfolgt, das heißt, dass im Gegensatz zur N-Glykosylierung einzelne Zuckermonomere nacheinander auf die wachsende Glykankette übertragen werden [5]. Über die an der O-Glykosylierung von Hydroxyprolin beteiligten Glykosyltransferasen ist jedoch nichts bekannt, so dass eine Untersuchung der Glykosylierungsstrategien Hydroxyprolinreicher Glykoproteine nur über die Analyse der Glykoproteine und ihrer Glykanstrukturen erfolgen kann. Die Untersuchung Hydroxyprolin gebundener Glykane erweitert dabei nicht nur das Wissen über die posttranslationale Modifizierung der Proteine, sie hilft gleichzeitig auch dabei Biosynthesewege zu verstehen und Verwandtschaftsbeziehungen verschiedener Organismen evolutiv zu betrachten.

### 1.2 Extensine höherer Pflanzen

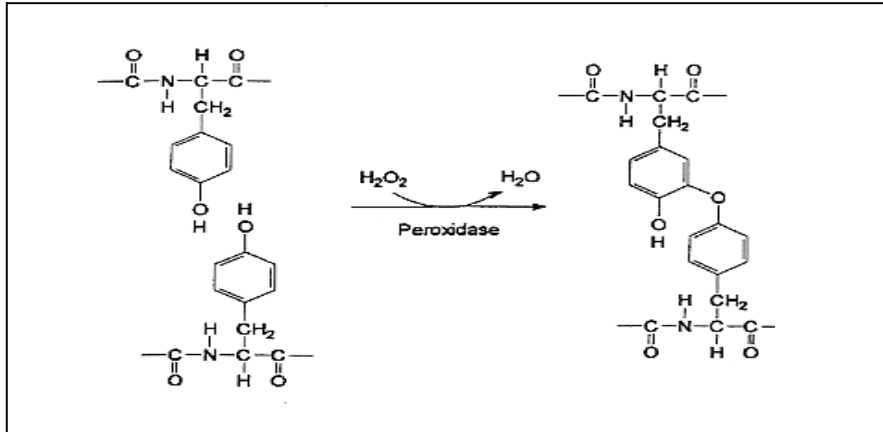
Die Hauptkomponente pflanzlicher Primärwände moderner Landpflanzen bildet, mit einem Gewichtsanteil von 20-30 % des Trockengewichts, das fibrilläre Grundgerüst der Cellulose. Die Cellulosefibrillen sind selber von einer Matrix aus Hemicellulosen, Pektinen und Proteinen umgeben, wobei die genaue Anordnung und die Anteile der einzelnen Komponenten von Gewebe zu Gewebe verschieden ist und sich während der Differenzierung der unterschiedlichen Pflanzenorgane verändert [6]. Von den Strukturproteinen pflanzlicher Primärwände war das Extensin aus Karotte das erste, das bereits im Jahre 1965 von Lamport charakterisiert werden konnte [7]. Der Anteil an Extensin in den Primärwänden höherer Pflanzen beträgt bis zu 15% des Trockengewichts. Der Name Extensin beschreibt eine Familie von Hydroxyprolinreichen Glykoproteinen, denen eine entscheidende Rolle beim extensiven (Streckungs-)Wachstum einer Pflanzenzelle zugeschrieben wird [8]. Darüber hinaus werden Extensine vermehrt bei Pathogen- oder Pilzbefall gebildet und besitzen weitere Funktionen bei Wundheilungsprozessen [9,10,11]. Aus morphologischer Sicht handelt es sich bei den Extensinen um faserförmige Proteinstrukturen, häufig mit charakteristischen Knicken (Abbildung 2).



**Abb. 2:** Elektronenmikroskopische Aufnahme von Extensinmolekülen aus Karotte [12].

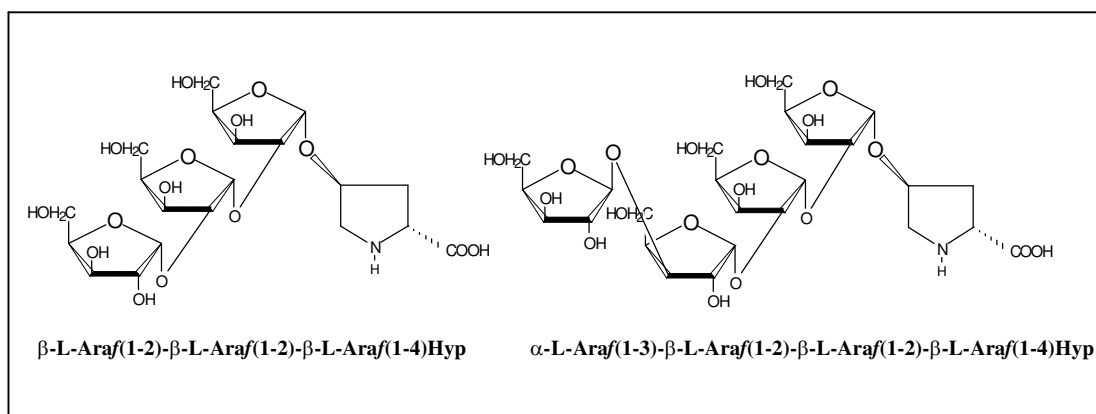
Extensine besitzen eine Reihe gemeinsamer Eigenschaften [12,13]. Sie bilden eine Gruppe von basischen Glykoproteinen, die aufgrund ihres hohen Lysinanteils einen pI von etwa 10 besitzen. Eines der wesentlichen Strukturmerkmale der Extensine sind ausgedehnte Proteinbereiche, die das charakteristische Sekundärstrukturelement der Polyprolin-II-Helix tragen. Daneben besitzen alle Extensine charakteristische Aminosäuresequenzen, die sich aus typischen repetitiven Elementen zusammensetzen. Das wesentliche Sequenzmotiv für Extensine höherer Pflanzen ist die Aminosäurefolge (SerHyp<sub>4</sub>).

Darüber hinaus sind Extensine höherer Pflanzen über inter- und intramolekulare Quervernetzungen stabilisiert. Ein im Pflanzen und Tierreich weit verbreiteter Mechanismus dieser Quervernetzungen ist die oxidative Verknüpfung von Phenylresten. Bei der Sojabohne konnte die Bildung von intramolekularen Tyrosindimeren in Hydroxyprolinreichen Glykoproteinen als Folge von Abwehrreaktionen bei Pilzinfektionen oder Verwundung nachgewiesen werden (Abbildung 3) [14,15]. Fry beschrieb außerdem 1998 die Rolle von Pulcherosin einem oxidativ verknüpften Tyrosintrimer bei der intermolekularen Quervernetzung von primären Zellwänden in Tomatenzellkulturen [16].



**Abb. 3:** Modell der Peroxidase katalysierten Bildung von Tyrosindimeren (nach Fry, 1982). Unter  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Verbrauch wird aus zwei Tyrosinseitenketten die Etherverbindung Isodityrosin gebildet [17].

Eine weitere Gemeinsamkeit von Extensinen höherer Pflanzen ist ihr hoher Kohlenhydratanteil von 50-60 % an der Gesamtmasse. Die Verknüpfung der Zuckermonomere erfolgt dabei O-glykosidisch und mit einem Anteil von über 90 % an Hydroxyprolin. Daneben werden mit einem Anteil von etwa 10 % auch O-glykosylierte Serinreste vorgefunden, die jeweils einzelne Galaktoseeinheiten tragen [18]. Die an Hydroxyprolin gebundenen Glykane von Extensinen höherer Pflanzen bestehen aus drei oder vier linear an Hydroxyprolin gebundenen Arabinoseeinheiten (HypAra<sub>3</sub> und HypAra<sub>4</sub>) mit charakteristischer Verknüpfung der Arabinosemonomere untereinander (Abbildung 4). Die erste komplette Beschreibung der beiden Verbindungen erfolgte an Zellwandpräparationen aus *Nicotiana tabacum* durch Methylierungsanalyse und eindimensionale  $^{13}\text{C}$ -NMR Studien [19,20]. Weitere Studien wurden an Karotte, Stechapfel, Tomate und der Kartoffel durchgeführt [12,21,22,23].



**Abb. 4:** Struktur der HypGlykane HypAra<sub>3</sub> und HypAra<sub>4</sub> aus Extensinen höherer Pflanzen.

### 1.3 *Chlamydomonas reinhardtii* – Ein Modellorganismus

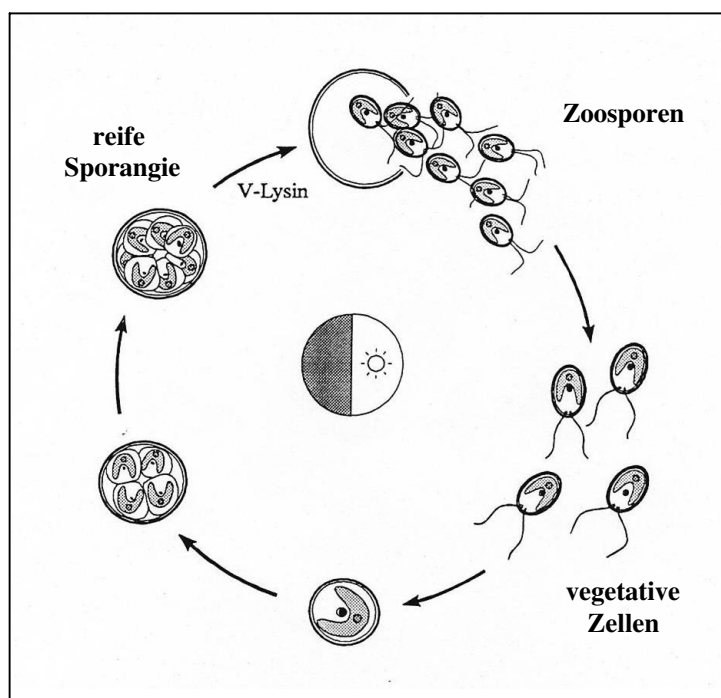
Die weite Verbreitung pflanzlicher Extensine unterstreicht die Bedeutung dieser Proteinfamilie. Neben den höheren Pflanzen besitzen auch viele einfache Organismen homologe Proteinstrukturen. Dazu gehört auch die einzellige Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*, deren Zellwand sich ausschließlich aus Hydroxyprolinreichen Glykoproteinen zusammensetzt. Historisch betrachtet wurde die Gattung *Chlamydomonas* erstmals im Jahre 1833 von Ehrenberg beschrieben. Sie umfasst die einzelligen Organismen aus der Klasse der *Chlorophyceen*. *Chlamydomonadeae* bevölkern weltweit die unterschiedlichsten Habitate, frei schwimmend in Süß-, Salz- und Brackwasser, aber auch mit eingeschränkter Beweglichkeit den Boden. Insgesamt sind über 450 verschiedene Arten bekannt<sup>[24]</sup>.

Ein Vergleich der aus cDNA und genomischer DNA abgeleiteten Aminosäuresequenzen von HRGPs aus Grünalgen und den Extensinen höherer Pflanzen unterstreicht den hohen Verwandtschaftsgrad der Proteine und lässt einen gemeinsamen evolutiven Ursprung vermuten <sup>[25,26,27,28,29]</sup>. Bei den HRGPs aus *Chlamydomonas* handelt es sich um chimäre Proteine mit globulären und faserförmigen Domänen. Die faserförmigen Domänen tragen, wie zuvor für die Extensine höherer Pflanzen beschrieben, repetitive Hydroxyprolin-Motive die das allen HRGPs gemeinsame Sekundärstrukturelement der Polyprolin-II-Helix ausbilden.

Zur Untersuchung Hydroxyprolinreicher Glykoproteine erfüllt die einzellige Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* nahezu ideale Grundvoraussetzungen. Der im Labor seit langer Zeit etablierte Organismus lässt sich ohne größeren Aufwand in hohen Mengen vermehren, wobei die Differenzierungsvorgänge durch bestimmte Licht- und Temperaturverhältnisse leicht synchronisiert werden können. Darüber hinaus setzt sich die Zellwand der Alge ausschließlich aus Hydroxyprolinreichen Glykoproteinen zusammen <sup>[30]</sup>. Der hohe Anteil der Proteine unterstreicht dabei gleichzeitig die Funktionalität der HRGPs in der *Chlamydomonas* Zellwand. Waffenschmidt et al. konnten zeigen, dass die Oligosaccharidseitenketten für die Erkennung der Zellwandglykoproteine durch spezifische Zellwandhydrolasen (V-Lysin) beim Umbau der Zellwände während der vegetativen Fortpflanzung eine entscheidende Rolle spielen <sup>[31,32,33]</sup>. Andere Hydroxyprolinreiche Glykoproteine, die Agglutinine, sind auf der Geißeloberfläche von *Chlamydomonas* lokalisiert und vermitteln dort die Zell-Zell-Erkennung der komplementären Paarungstypen bei der sexuellen Fortpflanzung der Alge <sup>[26,34,35]</sup>.

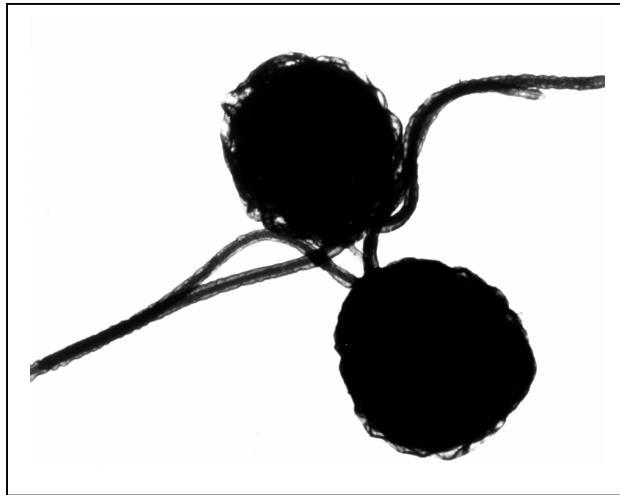
## 1.4 Fortpflanzung von *Chlamydomonas reinhardtii*

Unter optimaler Nährstoffversorgung vermehrt sich die Alge vegetativ [36]. Dabei wachsen die doppelt begeißelten, polaren Zellen zunächst erheblich. Ist das maximale Zellvolumen erreicht, ziehen die vegetativen Zellen ihre Geißeln ein und runden sich ab. Erst dann finden mitotische Teilungen statt. In der als Sporangium bezeichneten Mutterzelle befinden sich nach zwei bis drei Teilungen vier oder acht Tochterzellen, die neue Geißeln bilden, bevor sie aus dem Sporangium freigesetzt werden. Um das Schlüpfen der jungen Zoosporen zu ermöglichen, muss die Mutterzellwand abgebaut werden. Dies geschieht durch das Sporangien-Lysin (V-Lysin), das spezifisch die Sporangienzellwand auflöst, ohne dabei die Tochterzellwände anzugreifen [31,36,37]. Nach der Freisetzung der jungen Zoosporen beginnen diese einen erneuten Reproduktionszyklus mit der Wachstumsphase (Abbildung 5).



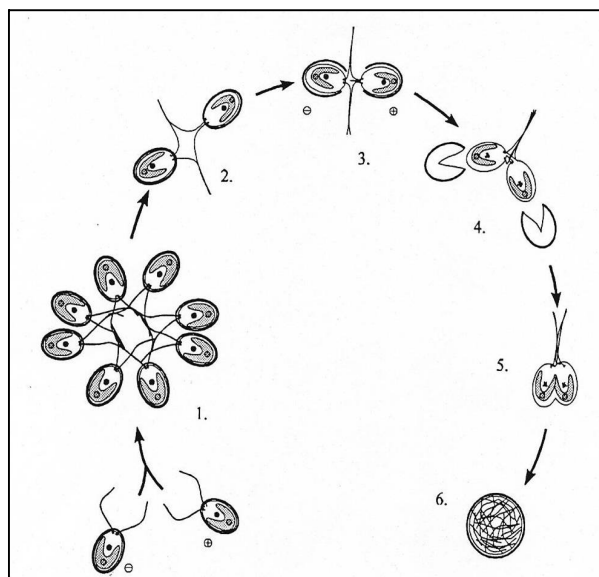
**Abb. 5:** Vegetativer Reproduktionszyklus von *Chlamydomonas reinhardtii* (nach Harris, 1989)<sup>[39]</sup>.

Unter ungünstigen Lebensbedingungen erfolgt die Reproduktion bei *Chlamydomonas reinhardtii* durch den sexuellen Fortpflanzungszyklus, der im Labor durch Verringerung des gebundenen Stickstoffes im Medium induziert werden kann [38]. Zoosporen differenzieren daraufhin entsprechend ihrer genetischen Anlage zu isomorphen plus- und minus- Gameten. Die komplementären Paarungstypen erkennen sich anhand spezieller HRGPs, den geißelgebundenen Agglutininen, und heften sich mit den Geißeln fest aneinander [34,35] (Abbildung 6).



**Abb. 6:** Paarung der Gameten während der sexuellen Fortpflanzung von *Chlamydomonas*.  
(Foto von U.W. Goodenough)

Diese Vorgänge induzieren die Freisetzung des Gameten-Lysins (G-Lysin), ein proteolytisches Enzym, das die Gametenzellwand aber auch die Zellwände aller vegetativen Zellstadien auflöst. Daraufhin können die als Protoplasten vorliegenden Gameten zu diploiden Präzygoten verschmelzen. Die Zygote (als Überdauerungsform) entsteht durch die Bildung einer sehr festen Zellwand nach dem einziehen der Geißeln. Erst unter wieder günstigen Lebensbedingungen wird eine meiotische Teilung eingeleitet und nach Auflösung der Zygotenwand werden vier haploide Zoosporen freigesetzt, mit denen ein neuer Lebenszyklus beginnen kann (Abbildung 7).

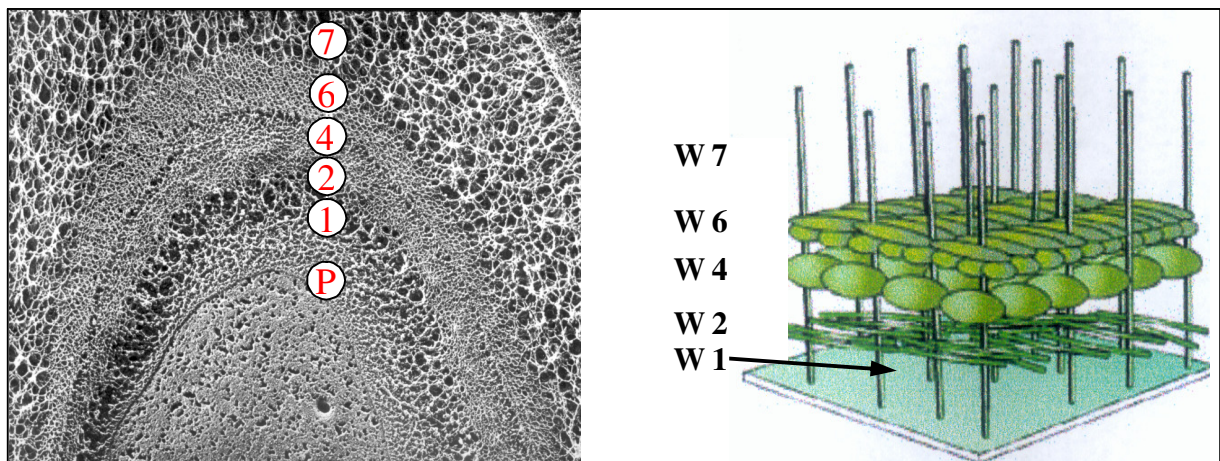


**Abb. 7:** Sexueller Reproduktionszyklus von *Chlamydomonas reinhardtii*. Zunächst bilden sich Zellaggregate durch Flagellenkontakte (1). Danach entstehen Fusionspaare (2). Die Ausbildung einer Cytoplasmabrücke und der Verlust der Zellwand durch G-Lysin (3,4) leiten die Zellfusion zur Zygote (5) ein. Diese entwickelt sich dann zur reifen Zygote fort (6) [39].

Ein Zygoten-Lysin ist nicht bekannt [40,41]. Das Gameten-Lysin und das Sporangien-Lysin hingegen sind von Jaenicke und Waffenschmidt isoliert und beschrieben worden [31,37]. Während das Gameten-Lysin Zellwände von Gameten und allen anderen vegetativen Zellstadien spalten kann, ist das Sporangien-Lysin spezifisch für die gereifte Sporangienwand. Es ist bekannt, dass für diese stadienspezifische Erkennung die Oligosaccharidseitenketten der Zellwandglykoproteine eine entscheidende Rolle spielen [31, 32]. Daher kann vermutet werden, dass sich die Zuckerzusammensetzung dieser Proteine im Verlauf der Zellteilungen verändert.

### 1.5 Glykoproteine der *Chlamydomonas* Zellwand

Im Gegensatz zu den Primärwänden höherer Pflanzen, die einen Extensinanteil von etwa 10 % an der Gesamtmasse der Zellwand besitzen, ist die Zellwand der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* fast vollständig aus Hydroxyprolinreichen Glykoproteinen aufgebaut. Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen konnte die Zellwand von *Chlamydomonas* nach Goodenough und Heuser (1985) in einem fünf Wandschichten umfassenden Zellwandmodell beschrieben werden [42] (Abbildung 8). Frühere Arbeiten von Roberts (1972) konnten dabei in so fern korrigiert werden, dass sich zwei der Wandschichten aus Roberts siebenschichtigen Modell als Leerräume darstellten (W3 und W5) [43].

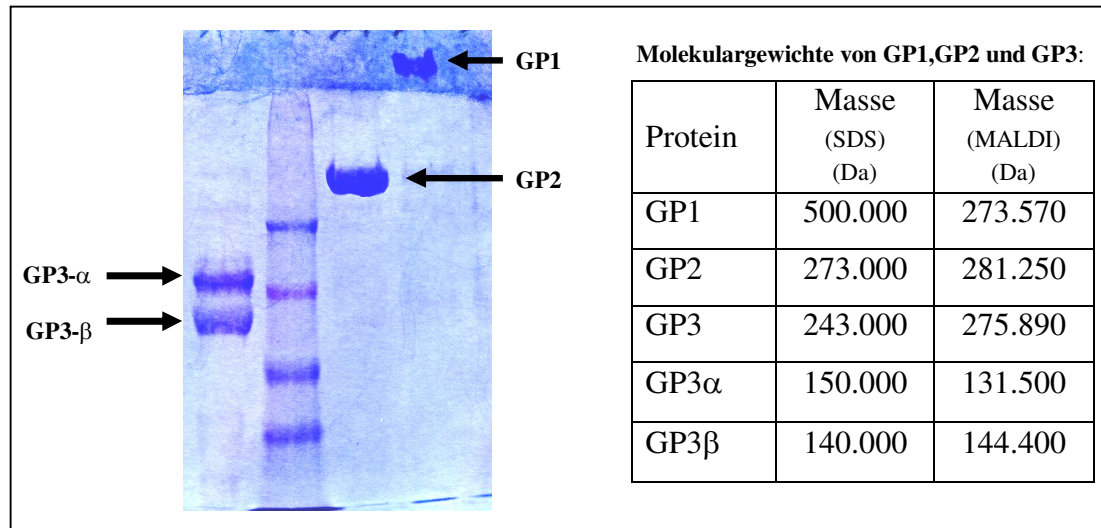


**Abb. 8:** Links: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Zellwand von *Chlamydomonas reinhardtii* nach Goodenough und Heuser [42]. Rechts: Schematische Darstellung der *Chlamydomonas* Zellwand; P=Plasmamembran; W=Wandschicht. Die Wandschichten W3 und W5 eines früher sieben-schichtigen Modells entfallen.

Die Glykoproteine der Wandschicht W1 sind fest mit der Plasmamembran verbunden und bilden ein radial nach außen verlaufendes lockeres Grundgerüst der *Chlamydomonas*-Zellwand. Bei der Wandschicht W2 handelt es sich um ein dichtes, stark quervernetztes Fasersystem, das parallel zur Plasmamembran verläuft. Die Quervernetzung erfolgt dabei überwiegend durch die Ausbildung von Isodityrosin- und Dityrosinbrücken [33,44]. Die Wandschichten W4 und W6 sind aus dichten Schichtungen faserförmiger HRGPs mit globulären Anteilen aufgebaut und bilden den Hauptanteil der *Chlamydomonas* Zellwand. Bei der Wandschicht W7 handelt es sich schließlich um die Fortsetzung der nach außen verlaufenden Fasern aus W1.

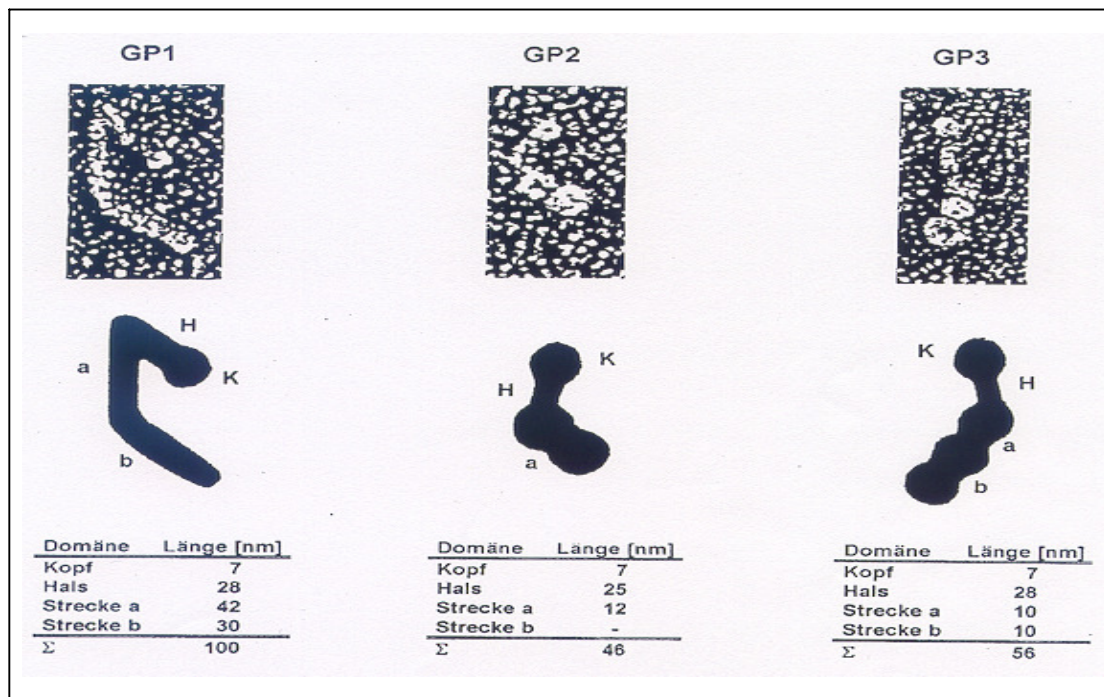
Aufgrund ihres Löslichkeitsverhaltens werden die Zellwandproteine von *Chlamydomonas reinhardtii* darüber hinaus in zwei Gruppen eingeteilt. Die innere Zellwand umfasst hierbei die kovalent quervernetzten Schichten W1, W2 und W7. Bei den Komponenten der äußeren Zellwand (Wandschichten W4 und W6) handelt es sich um Proteine, die lediglich über sekundäre Wechselwirkungen in das Grundgerüst der inneren Zellwand eingebettet sind. Diese Wandschichten lassen sich durch die Behandlung der *Chlamydomonas*-Zellen mit Chaotropen wie Natriumperchlorat vom Rest der Zellwand abtrennen und bilden die so genannte Perchloratlösliche Zellwand (PSW) [45]. Der Gewichtsanteil der Perchloratlöslichen Wand an der Gesamtmasse der Zellwand liegt bei etwa 90 %. Charakteristisch für die Proteine der PSW ist außerdem die Fähigkeit zur Ausbildung so genannter Self-Assembly Komplexe bei Entfernung des chaotropen Salzes unter Dialysebedingungen [45]. Diese Komplexe, die der nativen Zellwand sehr ähnlich sind, bestehen aus drei Hydroxyprolinreichen Glykoproteinen, die nach ihrem Laufverhalten bei der SDS-Gelelektrophorese als Glykoprotein 1, 2 und 3 bezeichnet werden (GP1, GP2 und GP3, Abbildung 9), wobei GP3 aus den beiden als  $\alpha$  und  $\beta$  bezeichneten Untereinheiten zusammengesetzt ist.





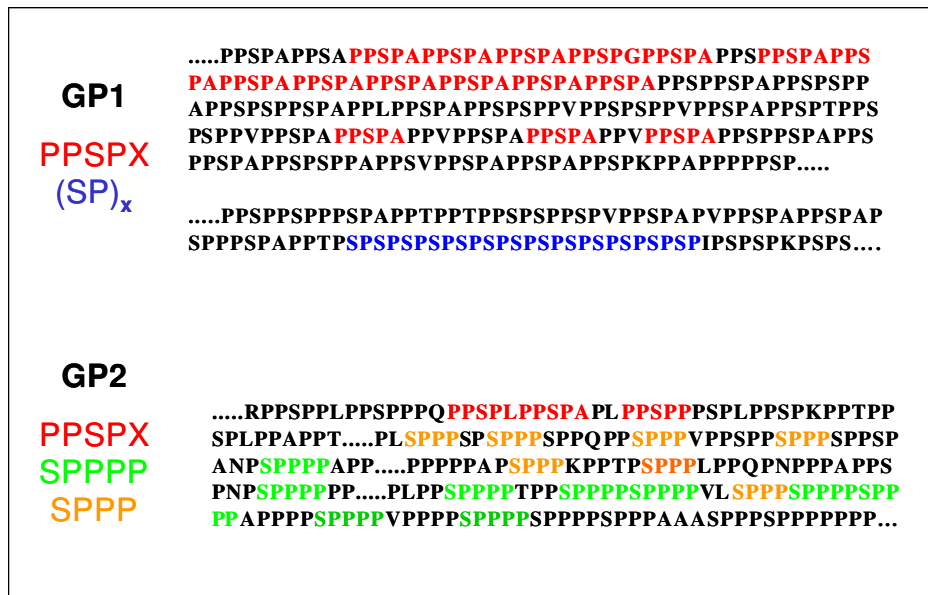
**Abb. 9:** SDS-Gelelektrophorese, perchloratextrahierter HRGPs aus *Chlamydomonas reinhardtii*. (Sammegel 4%, Trenngel 7,5 %). Färbung: Coomassie-Brilant-Blue. Die Molekulargewichte der Proteine wurden von Kilz et al. und Ferris et al. über MALDI-TOF-Analysen bestimmt [46,47].

Die Strukturen der gereinigten Glykoproteine aus *Chlamydomonas* konnten mit Hilfe der Rotary-Shadowing-Technik aufgezeigt werden. Abbildung 10 zeigt hierzu elektronenmikroskopische Aufnahmen von Goodenough et al. (1986) sowie die schematische Darstellung der Morphologien von GP1, GP2 und GP3, die aus diesen Aufnahmen ermittelt wurden [48].



**Abb. 10:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen und schematische Darstellungen der Glykoproteine GP1, GP2 und GP3 mit Längenangaben; beides nach Goodenough et al. (1986).

Die langgestreckte Gestalt von GP1 ist durch zwei Knicke gekennzeichnet, wohingegen GP2 und GP3 zwei bzw. drei globuläre Domänen besitzen. In den globulären Anteilen (K) werden spezifische Interaktionsdomänen vermutet [48]. Die faserförmigen Domänen (H) der beiden Proteine GP2 und GP3 zeigen eine strukturelle Verwandtschaft mit dem Hals von GP1, aber auch mit den Knick-Regionen (a) und (b). Aufgrund dieser Gemeinsamkeit wurde zunächst vermutet, dass GP1, GP2 und GP3 dem gleichen HRGP-Subtyp entstammen [42]. Dieser Annahme widersprechen jedoch neuere molekularbiologische Untersuchungen (Ferris et al. 2001 und Ferris, persönliche Mitteilung). Denn in der Zwischenzeit konnten GP1 und GP2 vollständig sequenziert und ihre Primärsequenz abgeleitet werden. Zwar tragen die Glykoproteine der äußeren Zellwand von *Chlamydomonas* zu den Extensinen höherer Pflanzen vergleichbare, hochrepetitive Aminosäuremotive, die Diversität dieser Elemente ist jedoch bei der Grünalge im Vergleich zu höheren Pflanzen deutlich größer [47]. Die Glykoproteine GP1 und GP2 unterscheiden sich untereinander ebenfalls in der Art und den Anteilen dieser Module. So trägt die Aminosäuresequenz von GP1 hauptsächlich die für dieses Protein charakteristischen PPSPX-Einheiten und alternierende SP-Einheiten. GP2 besitzt zwar auch anteilig diese Module, ist aber mit größerem Anteil ebenso aus den für höhere Pflanzen beschriebenen SP<sub>3</sub>- und SP<sub>4</sub>-Sequenzfolgen zusammengesetzt (Abbildung 11).



**Abb. 11:** Repetitive Elemente der hochglykosylierten fibrillären Anteile von GP1 und GP2 der äußeren Zellwand von *Chlamydomonas reinhardtii*.

## 1.6 Hydroxyprolingebundene Glykane aus der äußeren Zellwand von *Chlamydomonas reinhardtii*

Über den Code der O-Glykosylierung bei *Chlamydomonas reinhardtii* ist bislang nichts bekannt. Auch die Kenntnisse über die Strukturen von Hydroxyprolin gebundenen Glykanen der *Chlamydomonas* Wand und ihrer Biosynthese sind bis zum heutigen Zeitpunkt begrenzt. Durch Untersuchungen von MILLER et al. (1972), die an einem Gemisch aus ultraschalllöslichen HRGPs durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass 95% aller Hydroxyprolinreste der Zellwand-HRGPs von *Chlamydomonas reinhardtii* glykosyliert sind. Darüber hinaus konnten die Autoren die Monosaccharide L-Arabinose, D-Galaktose und D-Glukose als Bestandteile von Hydroxyprolin gebundenen Glykanen der genannten Proteine nachweisen [49]. KILZ ist es im Jahr 2000 gelungen, durch HPLC-ESI-MS<sup>n</sup>-Experimente die vorgereinigten Glykoproteine GP1, GP2 und GP3 aus der Zellwand von *Chlamydomonas reinhardtii* aufgrund ihrer Hydroxyprolinglykane zu charakterisieren [50]. Bei seinen Untersuchungen konnte er über 20 verschiedene Hydroxyprolin gebundene Glykane identifizieren und Aussagen über ihre Zuckerzusammensetzung sowie die Sequenzfolge der Pentose- und Hexoseeinheiten treffen. KILZ stellte auch fest, dass einige der analysierten Verbindungen zum Teil auch monomethylierte Zuckermomere tragen. Darüber hinaus ist es bislang nicht gelungen die vollständige Struktur einzelner Hydroxyprolin gebundener Glykane aus *Chlamydomonas* zu beschreiben.

### 1.7 Zielsetzung und Aufbau der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die strukturelle Untersuchung Hydroxyprolin gebundener Glykane der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*. Zur Etablierung der Methodik und zum Vergleich der *Chlamydomonas* Glykane zu den Extensinen höherer Pflanzen wurden weitere Studien an *Arabidopsis thaliana* Präparationen durchgeführt. Im ersten Teil der Arbeiten sollten die Hydroxyprolin gebundenen Glykane beider Organismen vergleichend analysiert und vollständig strukturell beschrieben werden. Zusätzlich wurden Untersuchungen an Zellwandhydrolysaten einer weiteren Algenart, an *Chlamydomonas incerta*, durchgeführt. Beide *Chlamydomonas*arten liegen evolutiv betrachtet etwa 500 Millionen Jahre auseinander, so dass der Vergleich der beiden Arten zeigen sollte, ob sich bestimmte, der Gattung *Chlamydomonas* spezifische Strukturelemente ermitteln lassen [51]. Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Abhängigkeit der Glykosylierung vom Zellzyklus auf der Wachstumsebene von *Chlamydomonas reinhardtii*. Hierbei wurde untersucht, ob sich stadienabhängig Glykosylierungsunterschiede feststellen lassen, die die spezifische Lyse der Zellwände im Verlauf einer vegetativen Zellteilung erklären können.

## 2 Ergebnissteil

### 2.1 Lineare Hydroxyprolin gebundene Glykane aus *Arabidopsis thaliana*

#### 2.1.1 Reinigung von HypGlykanen aus *Arabidopsis thaliana*

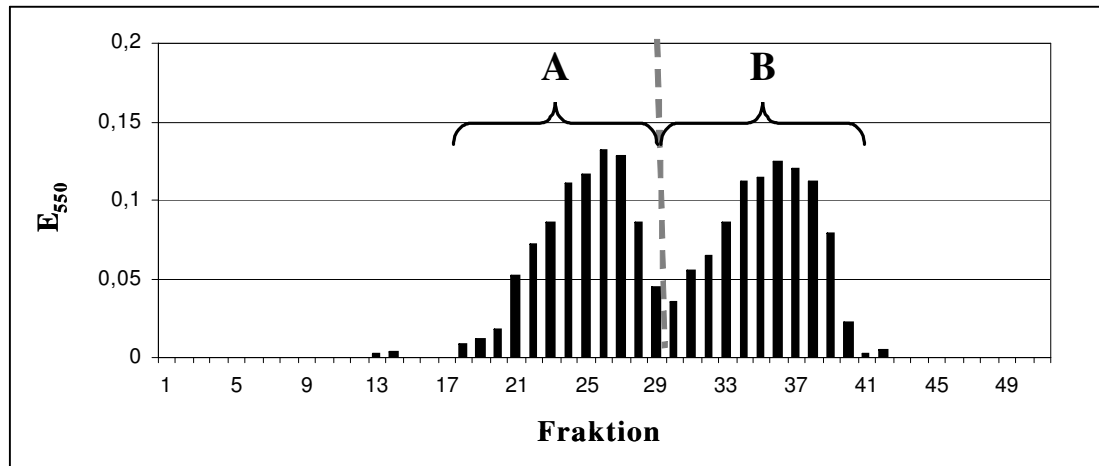
Das Ausgangsmaterial für die Untersuchungen an linearen Hydroxyprolin gebundenen Glykanen aus *Arabidopsis thaliana*, liefern etwa 3 g (Trockengewicht) einer mit *Phytophthora sojae* Elicitor behandelten Zell-Kultur. Die Elicitorbehandlung simuliert dabei einen Pilzbefall, der den Organismus zu einer verstärkten Extensinproduktion anregt [14]. Die an Hydroxyprolin gebundenen Glykane dieser Extensine wurden direkt durch alkalische Hydrolyse freigesetzt. Die Methode hat dabei den Vorteil, dass nur die Peptidbindungen, nicht aber die Hydroxyprolin-Zucker-Bindungen gespalten werden können und somit keine freien Glykane entstehen. Glykane anderer Aminosäuren, beispielsweise an Serin gebundene einzelne Galaktosen (Kapitel 1.2) werden durch  $\beta$ -Eliminierung im Gegensatz hierzu abgespalten.

Bei der alkalischen Hydrolyse wurden die Zellen über einen Zeitraum von zwanzig Stunden in einer 0,44 N Bariumhydroxidlösung zum Sieden erhitzt und das Hydrolysat mit 0,2 N Schwefelsäure neutralisiert. Ein weiterer Vorteil dieser Aufarbeitung liegt darin, dass das dabei entstehende Bariumsulfat leicht durch Zentrifugieren entfernt werden kann.

Zur Vorreinigung der einzelnen HypGlykane wurde das Hydrolysat über eine Kationenaustauschchromatographie an Aminex-Material (Hersteller: BioRad®), fraktioniert. Die Aminexchromatographie erfüllt dabei zunächst die Funktion, die Hydroxyprolin gebundenen Glykane von den anderen Aminosäuren der Glykoproteine zu trennen. Außerdem zeigen die Chromatogramme, dass zusätzlich eine Vortrennung der Glykane selber über das Größenausschlussprinzip erfolgt.

Ein Problem bei der Analytik von Kohlenhydraten ist jedoch grundsätzlich die Detektierbarkeit der Substanzen. Aufgrund ihrer Absorptionseigenschaften können an Hydroxyprolin gebundene Glykane nur mit unzureichender Genauigkeit und Empfindlichkeit photometrisch bestimmt werden. Daher wurde der Hydroxyprolingehalt einer Fraktion über die von Kivirikko im Jahre 1963 entwickelte, chemische Nachweismethode bestimmt [52] (Kapitel 4.2). Der durch die Anwesenheit von Hydroxyprolin gebildete rote Farbkomplex kann hierbei photometrisch bei einer Wellenlänge von 550 nm bis zu einer Nachweisgrenze von 1  $\mu\text{g/ml}$  ermittelt werden.

Abbildung 12 zeigt das so erhaltene Elutionsprofil der Kationenaustauschchromatographie von Hydroxyprolin gebundenen Glykanen aus *Arabidopsis thaliana*.

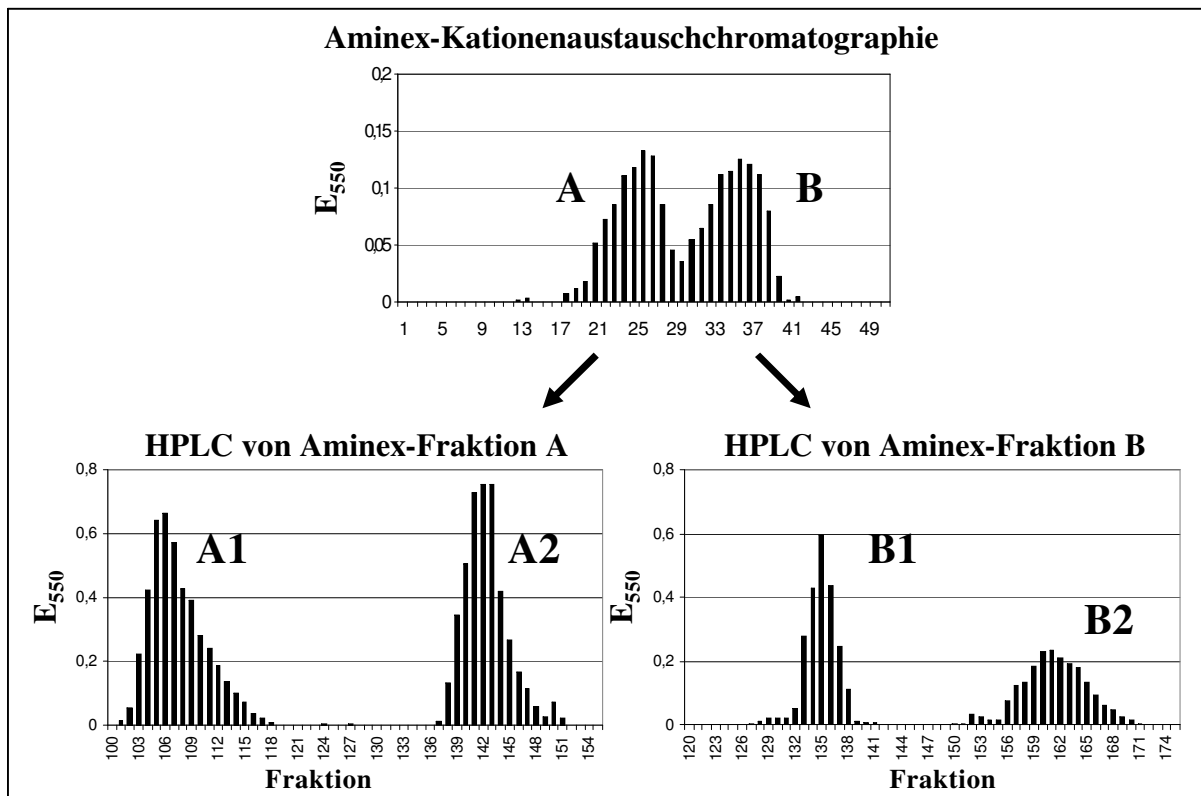


**Abb.12:** Elutionsprofil einer Kationenaustauschchromatographie alkalisch hydrolysierter *Arabidopsis thaliana*-Zellen. Die Bestimmung der Signalfaktionen erfolgte nach der Methode von Kivirikko [52].

Das Chromatogramm zeigt die Anreicherung von HypGlykanen in den zwei Signalbereichen A und B. Die Fraktionen dieser Signalbereiche wurden jeweils vereinigt und beide Gesamtfaktionen A und B getrennt weiter untersucht. Zunächst wurden die Fraktionen durch Gelfiltration über P2-Material entsalzt und anschließend durch HPLC über eine  $\text{NH}_2$ -Aminopropylphase weiter fraktioniert.

Die Reinigung von Hydroxyprolin gebundenen Glykanen an einer HPLC-Aminopropylphase ist von Kilz im Rahmen seiner Dissertation im Jahr 2002 entwickelt worden [53]. Kilz verwendete die Methode analytisch, um etwa 20 Hydroxyprolin gebundene Glykane aus der äußeren Zellwand von *Chlamydomonas reinhardtii* zu trennen und massenspektrometrisch zu charakterisieren. Zur Gewinnung der für die Strukturaufklärung benötigten Mengen, musste die Methode jedoch auf präparativen Maßstab umgestellt werden (Kapitel 4.1.10).

Abbildung 13 zeigt die Elutionsprofile der präparativen HPLC-Trennungen der Aminex-Faktionen A und B aus *Arabidopsis thaliana*.



**Abb. 13:** HPLC-Trennung der Aminex-Fractionen A und B. Die Bestimmung des Hydroxyprolinegehaltes einer Fraktion erfolgte nach der Methode von Kivirikko [52].

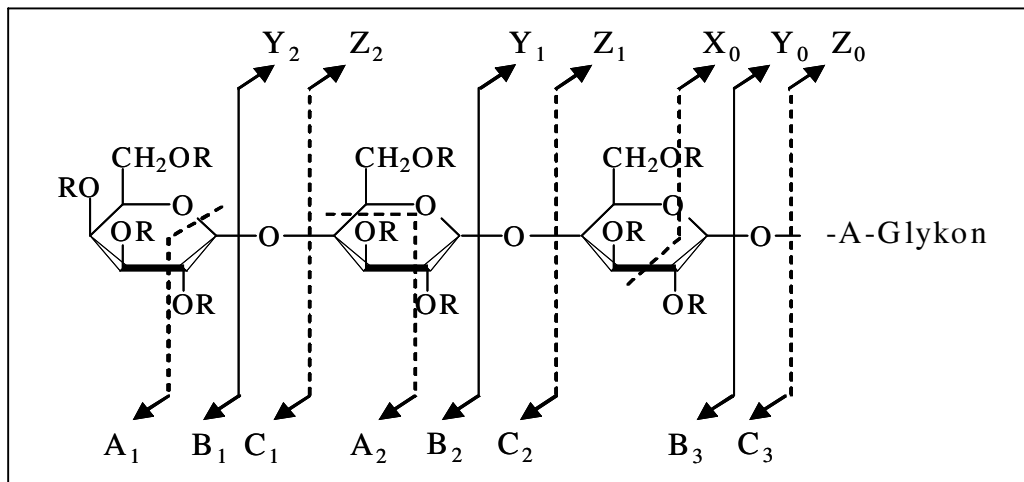
Die Elutionsprofile der beiden HPLC-Läufe zeigen jeweils zwei Signalbereiche (A1, A2 und B1, B2). Es ergeben sich also insgesamt vier Signale, obwohl nur zwei zu erwarten wären, da für Extensine höherer Pflanzen wie Tabak und Karotte lediglich die Hydroxyprolin gebundenen Glykane HypAra<sub>3</sub> und HypAra<sub>4</sub> beschrieben sind [20].

Andererseits wurden von Tan et al. bei NMR-Studien an komplexen Hydroxyprolin gebundenen Glykanen aus Arabinogalaktanproteinen zwei Gruppen von Verbindungen beschrieben, die sich strukturell lediglich bezüglich bestimmter NMR-Signale unterscheiden lassen [54]. Tan et al. interpretierten diese Ergebnisse als Resultat einer, durch die alkalische Hydrolyse der Aufarbeitung verursachten Cis-Trans-Isomerie an Hydroxyprolin. Diese Hypothese konnten die Autoren damals aber nicht beweisen.

Zur Untersuchung der vier HPLC-Signale und zur strukturellen Beschreibung der aus *Arabidopsis* isolierten und gereinigten HypGlykane, wurden massenspektrometrische und gaschromatographische Methoden sowie die magnetische Kernresonanzspektrometrie eingesetzt.

### 2.1.2 ESI-MS Analyse von HypGlykanen aus *Arabidopsis thaliana*

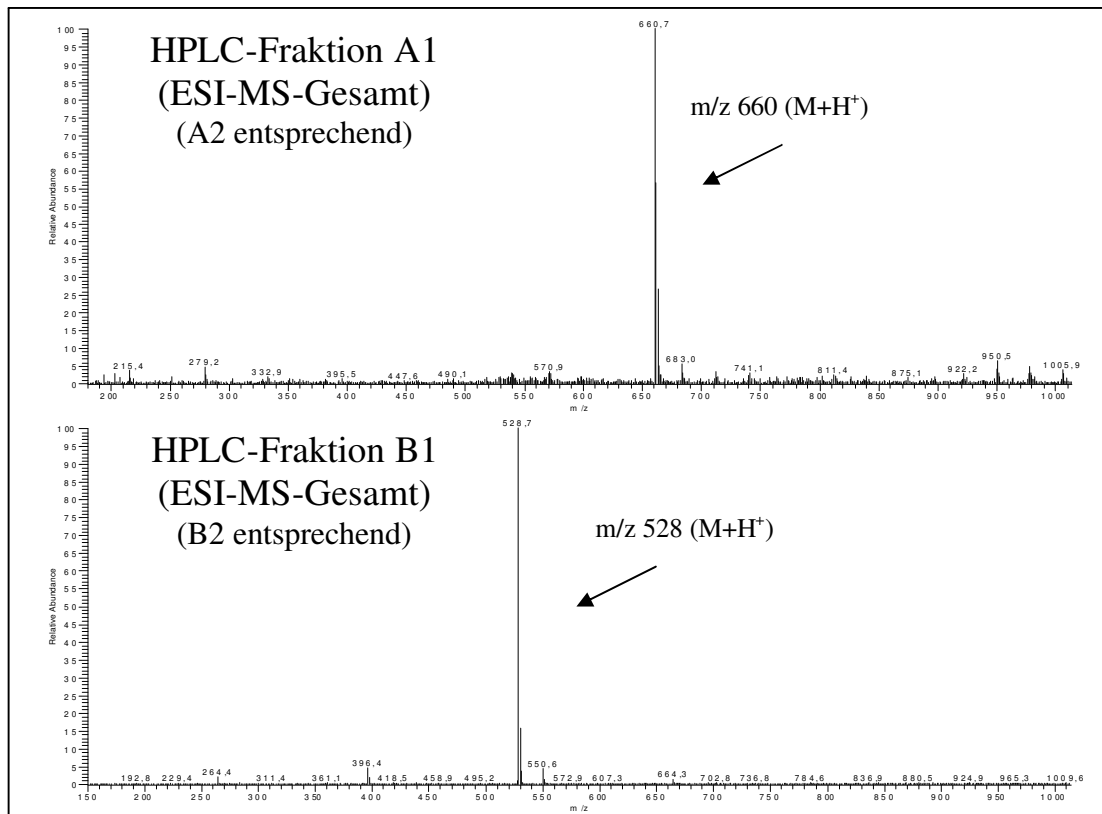
Die ESI-Massenspektrometrie dient zunächst der Gesamtmassenbestimmung der Hydroxyprolin gebundenen Glykane. Darüber hinaus geben ESI-MS<sup>n</sup>-Stoßexperimente wichtige Informationen über die Sequenzfolge der Monomerbestandteile der Verbindungen. Bei der ESI-MS-Analyse wurden unter den verwendeten Parametern fast ausschließlich die einfach geladenen Wasserstoff- bzw. Natriumaddukte der jeweiligen Glykane im positiven Modus gemessen. Die kollisionsinduzierte Fragmentierung von linearen und verzweigten Glykanen führt spezifisch überwiegend zu Bindungsbrüchen an den glykosidischen Bindungen [55]. Dabei entstehen größtenteils die Molekülonen der Y-Serie. Die positive Ladung verbleibt hier jeweils am reduzierenden Ende (Kapitel 4.3, Abbildung 14).



**Abb. 14:** Nomenklatur von ESI-MS<sup>n</sup>-Fragmenten von linearen Glykanen nach Domon und Costello [57].

Betrachtet man die ESI-MS Gesamtspektren der vier aus der *Arabidopsis*-Aufarbeitung gewonnenen HPLC-Fraktionen, so lassen sich jeweils bei den Spektren der Fraktionen A1 und A2 sowie B1 und B2 identische Ionenspuren feststellen (Abbildung 15).

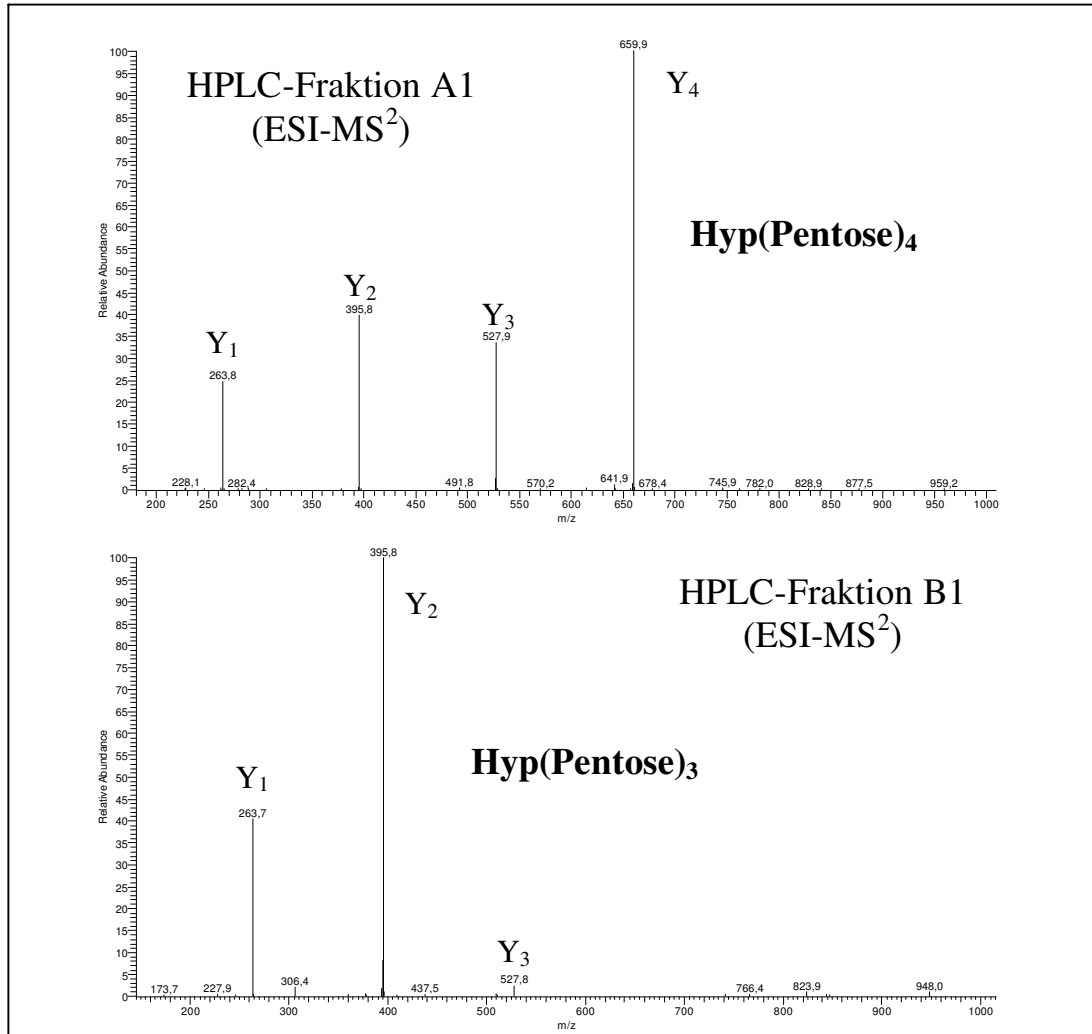




**Abb. 15:** ESI-Gesamtspektren der HPLC-Fraktionen A1 und B1. Zu sehen sind die Ionenspuren Hydroxyprolin gebundener Glykane in relativer Intensität zum Verhältnis Masse zu Ladung [m/z].

Bei den HPLC-Fraktionen B1 und B2 treten die Signale jeweils eines Hydroxyprolin gebundenen Glykans einer Masse von 527 u (m/z 528) auf. Bei den HPLC-Fraktionen A1 und A2 lassen sich die Ionenspuren je eines HypGlykans einer Masse von 659 u (m/z 660) beobachten (Die Gesamtspektren der HPLC-Fraktionen A2 und B2 sind dem Anhang auf den Seiten 143 und 145 beigelegt).

Auch die MS<sup>2</sup>-Stoßfragmentierungen zeigen für die Verbindungen gleicher Gesamtmassen jeweils identische Fragmentierungsmuster (Abbildung 16).



**Abb. 16:** ESI-MS<sup>2</sup>-Tochterionenspektren der aus *Arabidopsis thaliana* isolierten HypGlykane aus den HPLC-Fraktionen A1 und B1. Zu sehen sind die jeweiligen Fragmentationen der Y-Serie im Verhältnis m/z zur relativen Intensität. Die ESI-MS<sup>2</sup>-Tochterionenspektren der HPLC-Fraktionen A2 und B2 sind dem Anhang auf den Seiten 143 und 145 beigelegt.

Im Falle der HypGlykane der HPLC-Fraktionen A1 und A2, beide mit einem Molekulargewicht von 659 u, lassen sich die Tochterionen bei m/z 528 (Y<sub>3</sub>), m/z 396 (Y<sub>2</sub>) und m/z 264 (Y<sub>1</sub>) durch den linearen, Verlust von drei Pentoseeinheiten (jeweils 132 u) erklären. Das Fragmentation bei m/z 264 beschreibt außerdem das Wasserstoffaddukt einer vierten an Hydroxyprolin (131 u) gebundenen Pentoseeinheit. Es ergibt sich somit eine Glykansequenz von vier an Hydroxyprolin gebundenen Pentoseeinheiten (Abbildung 16 oben). Entsprechend erklären die Stoßfragmentierungen der beiden Glykane einer Masse von 527 u der HPLC-Fraktionen B1 und B2, über die Ionenspur bei m/z 396 und m/z 264, die um eine Pentoseeinheit kleineren Verbindungen (Abbildung 16 unten).

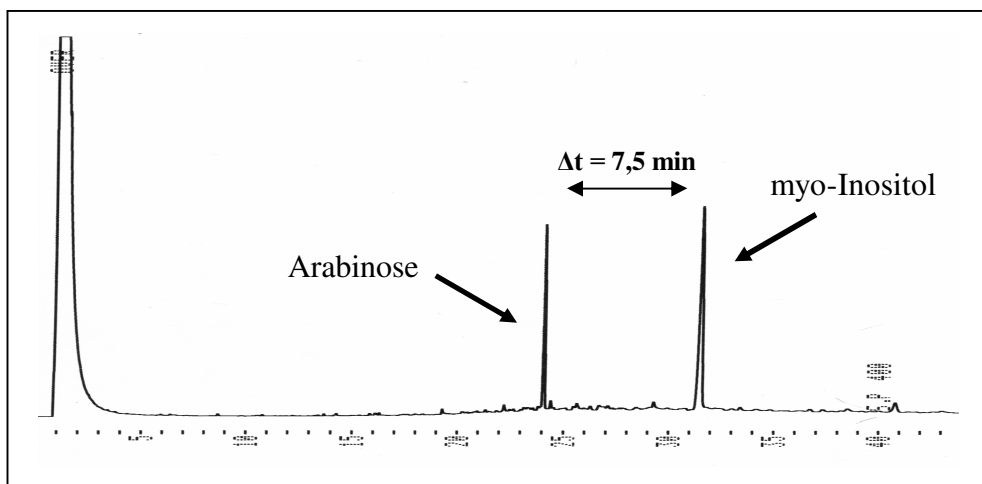
Insgesamt handelt es sich bei den vier aus *Arabidopsis thaliana* isolierten HypGlykanen also um jeweils zwei isobare Paare der Sequenzfolge Hyp(Pentose)<sub>3</sub> und Hyp(Pentose)<sub>4</sub>.

### 2.1.3 Gaschromatographische Analyse der *Arabidopsis thaliana* Glykane

Die anschließend durchgeführte gaschromatographische Analyse dient als Kontrolle für die in der Literatur beschriebene uniforme Verwendung von Arabinose als Kettenbaustein Hydroxyprolin gebundener Glykane in Extensinen höherer Pflanzen.

Zur gaschromatographischen Analyse wurden die HypGlykane der vier HPLC-Fractionen der *Arabidopsis*-Aufarbeitung zunächst durch Behandlung mit 2 N Trifluoressigsäure hydrolysiert. Danach wurden die Monomere durch Reduktion mit Natriumborhydrid in die entsprechenden Zuckeralditole überführt. Durch Derivatisierung der Proben mit MSTFA wurden die für die Gaschromatographie nötigen leichtflüchtigen Derivate geschaffen. Als Referenzzucker dienten die entsprechenden Derivate von Arabinose, Xylose, Glukose Galaktose und Mannose. Zur Bestimmung der relativen Retentionszeit wurden alle Proben außerdem durch den Zusatz von myo-Inositol intern standardisiert.

Die Zuckerzusammensetzung der aus *Arabidopsis thaliana* isolierten HypGlykane zeigt ein einheitliches Bild. Abbildung 17 zeigt exemplarisch die gaschromatographische Analyse von HPLC-Fraktion A1, einer der Fraktionen mit der massenspektrometrisch ermittelten Verbindung einer Sequenz von vier linear aufeinander folgenden an Hydroxyprolin gebundenen Pentoseeinheiten. Die Untersuchungen der drei anderen HPLC-Fractionen zeigen identische Ergebnisse.



**Abb. 17:** Gaschromatogramm von HPLC-Fraktion A1 (HypAra<sub>4</sub>). Die Signale entsprechen den trimethylsilylierten Derivaten von Arabinose und myo-Inositol.

Neben dem Signal des internen Standards myo-Inositol lässt sich bei allen vier HypGlykanen lediglich ein weiteres Signal beobachten, das sich über seine relative Retentionszeit von 7,5 Minuten als Arabinose identifizieren lässt. Es handelt sich also bei allen vier Verbindungen um reine Hydroxyprolinarabinoside.

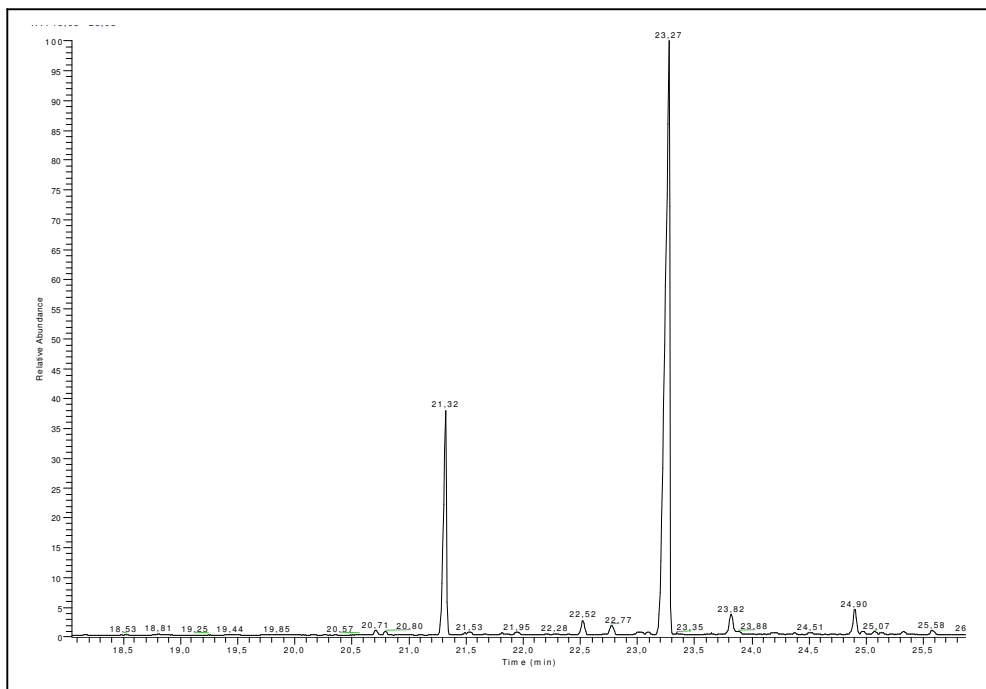
#### 2.1.4 Methylierungsanalyse der *Arabidopsis thaliana* Glykane

Die Methylierungsanalyse dient zur Bestimmung der genauen Verknüpfungspositionen von einzelnen Zuckermonomeren innerhalb eines HypGlykans. Das Prinzip der Methylierungsanalyse besteht darin, durch unterschiedliche Derivatisierung bestimmter Molekülteile von Zuckermonomeren innerhalb einer Glykankette (freie Hydroxylgruppen, Ringpositionen, Verknüpfungspositionen) Derivate zu erzeugen, die anschließend gaschromatographisch getrennt werden und bei nachfolgender massenspektrometrischer Analyse eindeutige Fragmente ergeben (GC-MS) [56,57,58].

Bei der Methylierungsanalyse wurden die an Hydroxyprolin gebundenen Glykane zunächst durch Zusatz von Deuteromethyljodid perdeuteromethyliert, um so die freien OH-Gruppen der Zuckerkette entsprechend zu markieren. Eine Perdeuteromethylierung war erforderlich, da einige Verbindungen der an späterer Stelle dargestellten *Chlamydomonas* Glykane eigene Methylgruppen tragen und die Deuteromethylgruppen von diesen natürlichen Methylgruppen über ihren Massenunterschied von 3 u unterschieden werden können. Die anschließende saure Hydrolyse der deuteromethylierten Derivate spaltet die Glykankette und legt somit die Verknüpfungspositionen frei. Durch Reduktion dieser Zwischenprodukte mit Natriumbordeuterid wird der Ring geöffnet und außerdem durch Deuterierung der C<sub>1</sub>-Position sichergestellt, dass die genaue Orientierung der Verbindungen zu erkennen ist und kein symmetrisches Produkt entsteht. Sowohl die freigelegten Verknüpfungs-, als auch die „freigelegte“ Ringposition eines Zuckermonomers werden anschließend durch Acetylierung mit Acetanhydrid weiter derivatisiert. Bei dieser Vorgehensweise entstehen je nach Art der Verknüpfung und je nach Ringposition (Furanosen, Pyranosen), über die unterschiedliche Positionierung von Deuteromethyl- und Acetylgruppen, spezifische Derivate der einzelnen Zuckermonomere (siehe Schema in Kapitel 4.5). Die auf diese Weise generierten partiell deuteromethylierten, partiell acetylierten Zuckeralditole wurden gaschromatographisch getrennt und massenspektrometrisch analysiert (GC-MS).

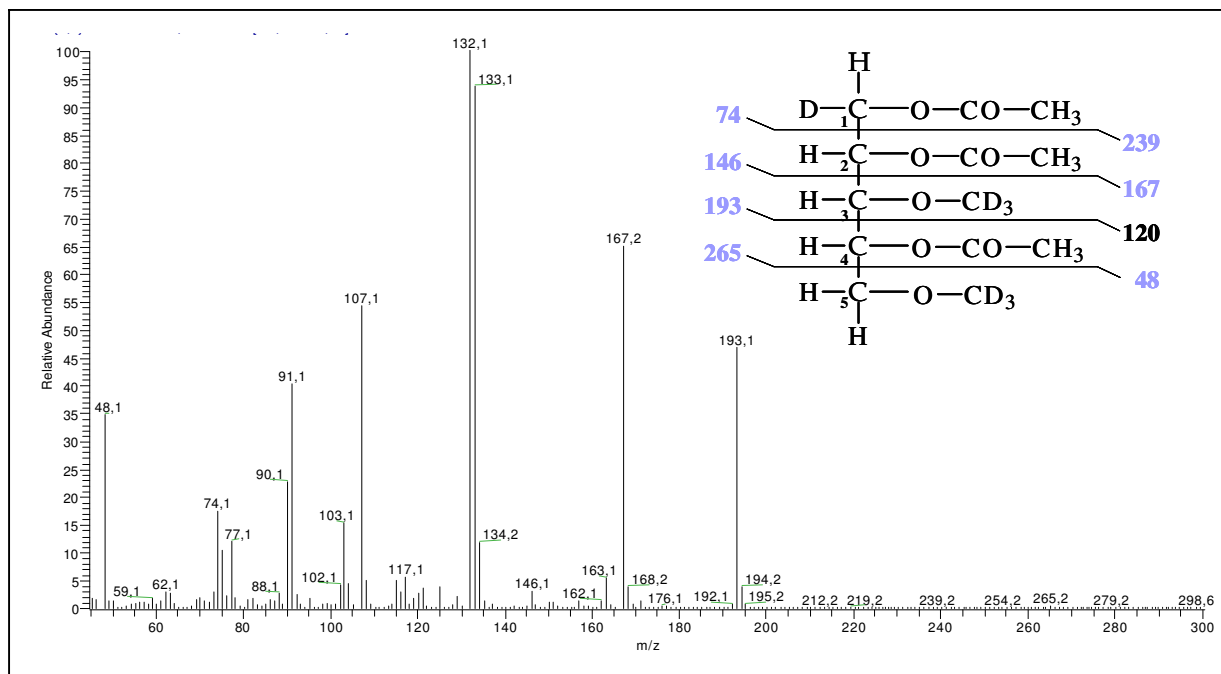
Die massenspektrometrische Analyse der gaschromatographisch getrennten, derivatisierten Zuckermomere erfolgte durch Elektronenstoßionisation (EI). Im Gegensatz zur der zuvor verwendeten Elektronen-Spray-Ionisation (ESI-MS) handelt es sich bei der Elektronenstoßionisation um eine „harte“ Ionisierungsmethode. In einem vergleichsweise hoch angelegten Spannungsfeld treten Bindungsbrüche vor allem zwischen den Kohlenstoffatomen des Zuckerrückgrades auf (Hauptfragmentationen). Außerdem entstehen McLafferty-Ionen bei Bindungsbrüchen des Zuckerrückgrades und gleichzeitiger Umlagerung von benachbarten Seitengruppen (Kapitel 4.5). Bei der EI-Fragmentierung von HypGlykanen treten in der Regel ausreichend viele Hauptfragmentationen auf, um die Positionen aller Seitengruppen eindeutig zuzuweisen. Die Betrachtung der EI-Spektren in diesem Ergebnisteil beschränkt sich daher weitgehend auf die Hauptfragmentationen.

Bei der Analyse von HypAra<sub>3</sub> (aus HPLC-Fraktionen B1) wurden nach Deuteromethylierung, Reduktion, Hydrolyse und Acetylierung gaschromatographisch zwei Signale beobachtet. Das Gaschromatogramm zur Analyse der Arabinosemonomere von HypAra<sub>3</sub> aus HPLC-Fraktion B1 zeigt diese beiden Signale mit den absoluten Retentionszeiten von 21,32 und 23,27 Minuten mit einem Signalfächenverhältnis von etwa 1:2 (Abbildung 18).



**Abb. 18:** Gaschromatogramm der Analyse von HypAra<sub>3</sub> (HPLC-Fraktion B1) aus *Arabidopsis thaliana*.

Betrachtet man zunächst die EI-Fragmentierung zum Zeitpunkt des größeren Signals, so zeigt sich ein Spektrum, dessen Ionenspuren die Positionierung aller Acetyl- und Deuteromethylgruppen eindeutig beschreiben (Abbildung 19).

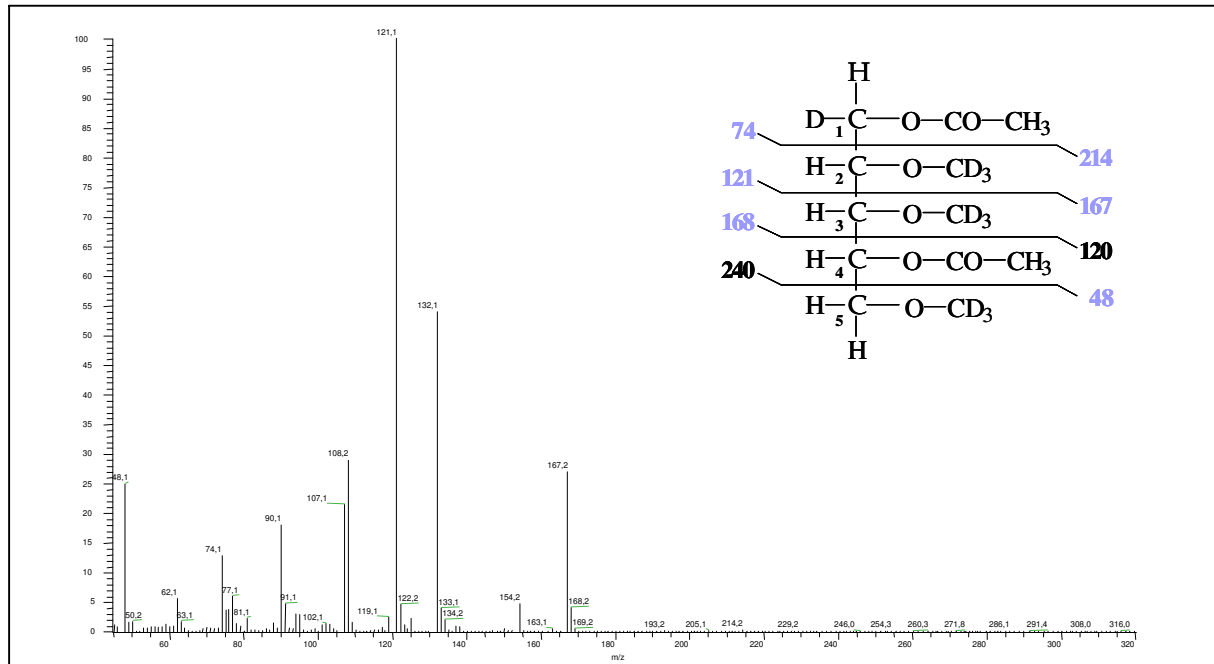


**Abb. 19:** EI-Fragmentierung des Derivates der 1,2 verbundenen Arabinose (1,2,4 Tri-O-Acetyl-1-Deuterio-3,5-Di-O-Deuteromethylarabinosid) aus HypAra<sub>3</sub> (HPLC-Fraktion B1).

Das Fragmentation bei m/z 146 entsteht bei der Spaltung des Kohlenstoffrückgrades unterhalb der C<sub>2</sub>-Position und kann durch die Acetylierung der ersten beiden Kohlenstoffatome im Molekül erklärt werden. Durch das Fragmentation bei m/z 48 wird die endständige Abspaltung der deuteromethylierten Position C<sub>5</sub> erklärt. Die Ionenspuren bei m/z 167 und m/z 193 erklären, unter Berücksichtigung des Fragmentes bei m/z 48, das Molekül an den Positionen C<sub>3</sub> und C<sub>4</sub>.

Ingesamt ergibt sich das charakteristische Bild der Fragmentierung des Derivates einer 1,2 verknüpften Arabinoseeinheit. Das Auftreten von nur zwei gaschromatographischen Signalen mit dem genannten Signalfächenverhältnis von 1:2 erlaubt darüber hinaus den Rückschluss, dass die zwei in der Kette befindlichen Arabinosen von HypAra<sub>3</sub> die gleichen Verknüpfungspositionen verwenden.

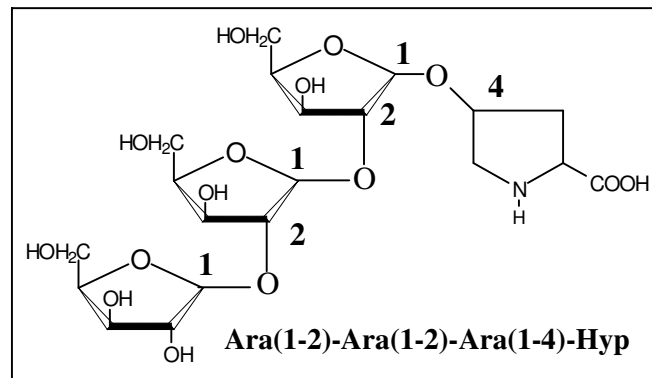
Die EI-Fragmentierung zum Zeitpunkt des kleineren gaschromatographischen Signals bei 21,32 Minuten beschreibt die Fragmentierung der dritten, terminalen Arabinoseeinheit von HypAra<sub>3</sub> (Abbildung 20).



**Abb. 20:** EI-Fragmentierung des Derivates von terminaler Arabinose (1,4 Di-O-Acetyl-1-Deuterio-2,3,5-Tri-O-Deuteromethylarabinosid) aus HPLC-Fraktion B1.

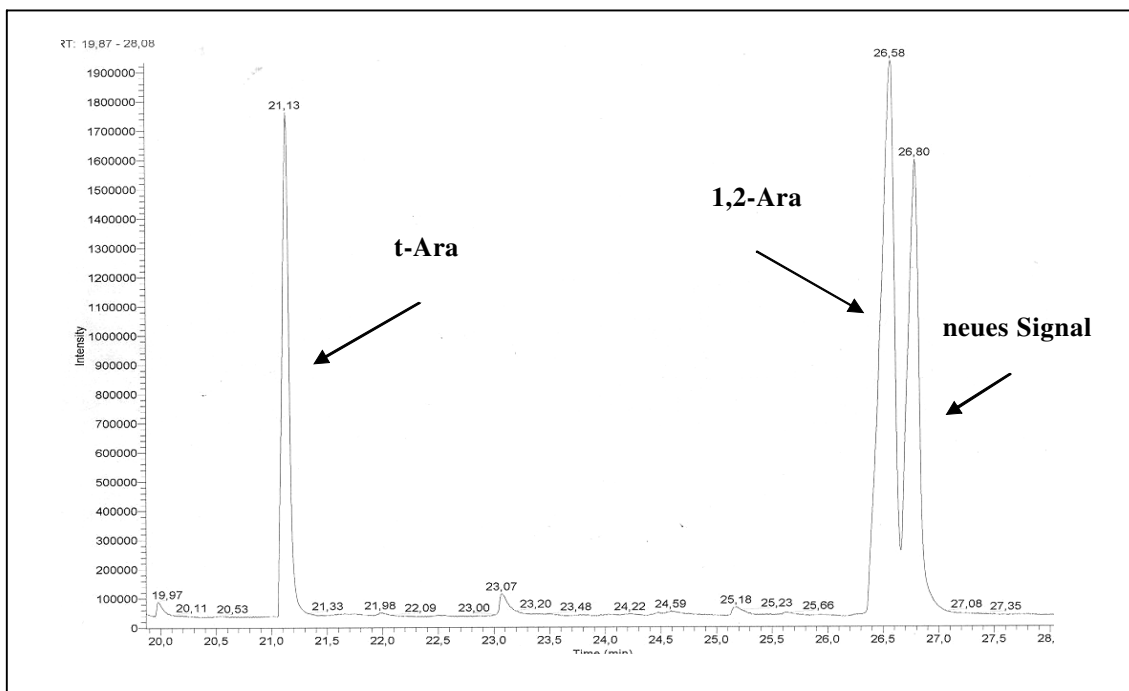
Im Vergleich zur zuvor dargestellten EI-Fragmentierung der 1,2 verbundenen Arabinose-monomere bleibt hier ein Signal bei m/z 146 aus. Die Hauptfragmentionen bei m/z 74 und m/z 121 belegen stattdessen, dass das Derivat an Kohlenstoffposition C<sub>2</sub> eine Deuteromethylgruppe trägt. Die native Struktur dieser Monomereinheit besitzt daher im Gegensatz zur kettenständigen 1,2 verbundenen Arabinose an dieser Position eine freie Hydroxylgruppe. Die Ionenspuren bei m/z 48, m/z 167 und m/z 168 beschreiben das Derivat an den Kohlenstoffpositionen C<sub>3</sub> bis C<sub>5</sub> und zeigen die Lage einer weiteren Acetylgruppe an der Ringposition C<sub>4</sub>. Es handelt sich daher um die terminale Arabinoseeinheit von HypAra<sub>3</sub>.

Insgesamt lässt sich die Verbindung HypAra<sub>3</sub> aus *Arabidopsis thaliana* wie für höhere Pflanzen beschrieben als Produkt zweier 1,2 verbundener Arabinoseeinheiten und einer terminalen, nur an Position 1 verbundenen Arabinoseeinheit darstellen (Abbildung 21).



**Abb. 21:** Verknüpfungspositionen der Arabinoseeinheiten von HypAra<sub>3</sub> aus *Arabidopsis thaliana*.

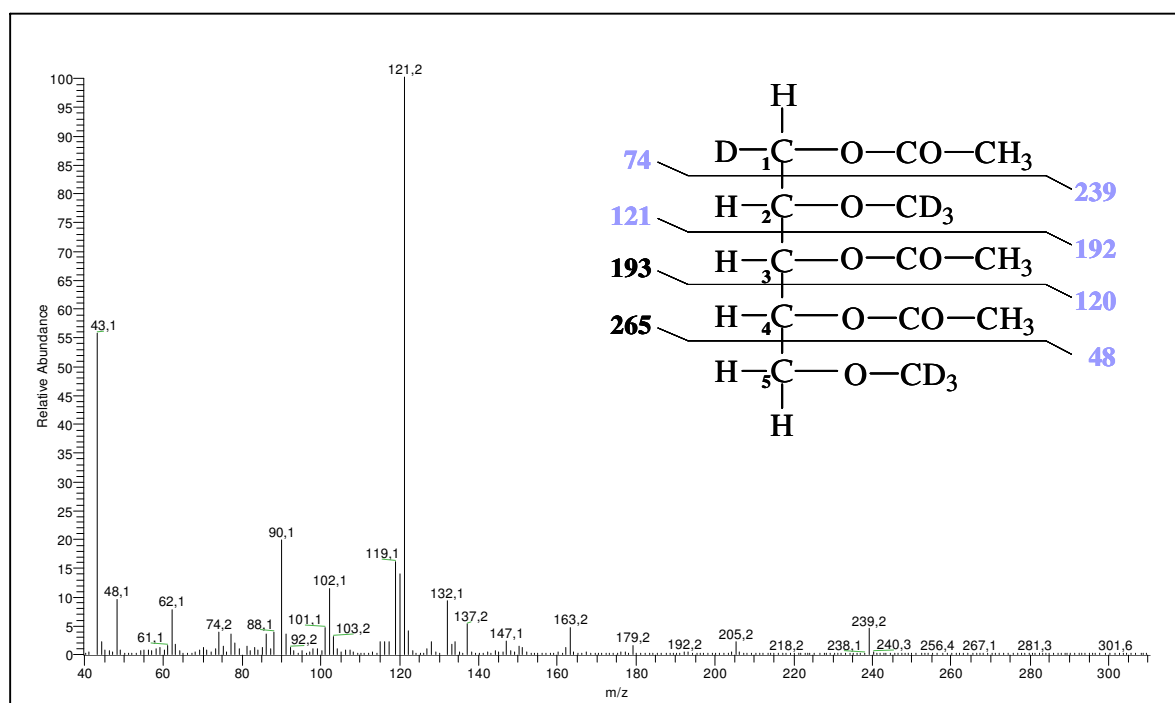
Die Methylierungsanalyse von HypAra<sub>4</sub> aus HPLC-Fraktion A1 der *Arabidopsis thaliana* Aufarbeitung zeigt in der gaschromatographischen Trennung zunächst drei Signale mit den Retentionszeiten 21,13 Minuten, 26,58 Minuten und 26,80 Minuten (Abbildung 22).



**Abb. 22:** Gaschromatogramm der GC-MS-Analyse von HypAra<sub>4</sub> (HPLC-Fraktion A1) aus *Arabidopsis thaliana*. Die EI-Fragmentierungen zu den Zeitpunkten 21,13 und 26,58 Minuten entsprechen den bei der Analyse von HypAra<sub>3</sub> erläuterten Fragmentierungsmustern von terminalen und 1,2 verknüpften Arabinosemonomeren. Das Signal bei 26,80 Minuten beschreibt eine neue Monomereinheit.



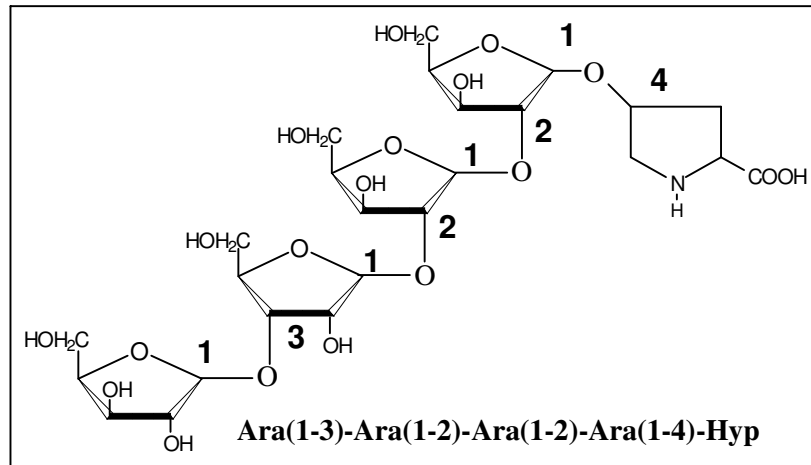
Um eine bessere Auflösung der beiden hinteren Signale zu erreichen, wurde eine andere Gaschromatographiesäule verwendet (s. Kapitel 4.4). Daher sind die Retentionszeiten nicht mit den zuvor für HypAra<sub>3</sub> ermittelten Werten zu vergleichen. Vergleichen lassen sich aber die EI-Spektren der beiden untersuchten HypGlykane zu den Zeitpunkten ihrer gaschromatographischen Signale. Dabei zeigen sich bei 21,13 und 26,58 Minuten die bereits erläuterten Fragmentierungsspektren von terminaler und 1,2-verbundener Arabinose. Die EI-Fragmentierung zum Zeitpunkt von 26,8 Minuten enthält aber im Vergleich zur Analyse von HypAra<sub>3</sub> ein neu auftretendes Signal und ist in Abbildung 23 dargestellt.



**Abb. 23:** EI-Fragmentierung des Derivates von 1,3 verknüpfter Arabinose (1,3,4 Tri-O-Acetyl-1-Deuterio-2,5-Di-O-Deuteromethylarabinosid) aus HypAra<sub>4</sub> (HPLC-Fraktion A1).

Die beiden Ionen bei m/z 48 und m/z 74 können hier den beiden Enden des Moleküls zugeordnet werden. Die Fragmente bei m/z 120 und m/z 121 belegen die Lage einer Deuteromethylgruppe an Kohlenstoffposition C<sub>2</sub> beziehungsweise einer Acetylgruppe an der Ringposition von Kohlenstoffatom C<sub>4</sub>. Aus den Ionenspuren bei m/z 192 und m/z 239 ergibt sich zusätzlich eine weitere Acetylgruppe an Kohlenstoffposition C<sub>3</sub>, so dass sich insgesamt das Fragmentierungsmuster einer 1,3 verbundenen Arabinoseeinheit ergibt.

Da die Biosynthese Hydroxyprolin gebundener Glykane, schrittweise durch den Einbau von UDP-Zuckern erfolgt (Kapitel 1.1), lässt sich folgern, dass die Struktur HypAra<sub>4</sub> aus HypAra<sub>3</sub> durch die Kettenverlängerung der terminalen Arabinoseeinheit dieser Verbindung an Kohlenstoffposition C<sub>3</sub> hervorgeht. Das HypGlykan HypAra<sub>4</sub> aus *Arabidopsis thaliana* lässt sich daher, wie in Abbildung 24 aufgeführt, darstellen.



**Abb. 24:** Verknüpfungspositionen der Arabinoseeinheiten von HypAra<sub>4</sub> aus *Arabidopsis thaliana*.

Insgesamt zeigen alle bisher dargestellten Analysen, dass es sich bei den Hydroxyprolin gebundenen Glykanen HypAra<sub>3</sub> und HypAra<sub>4</sub> aus *Arabidopsis thaliana* um die für Extensine höherer Pflanzen charakteristischen, bekannten Verbindungen handelt [19,20,21,22]. Darüber hinaus ergeben die Methylierungsanalysen keinen weiteren Hinweis auf das unterschiedliche chromatographische Laufverhalten der jeweils isobaren und gleichartig verknüpften Glykane. Die entsprechenden EI-Spektren zur Analyse der HPLC-Fractionen A2 und B2 sind dem Anhang ab Seite 152 beigelegt.

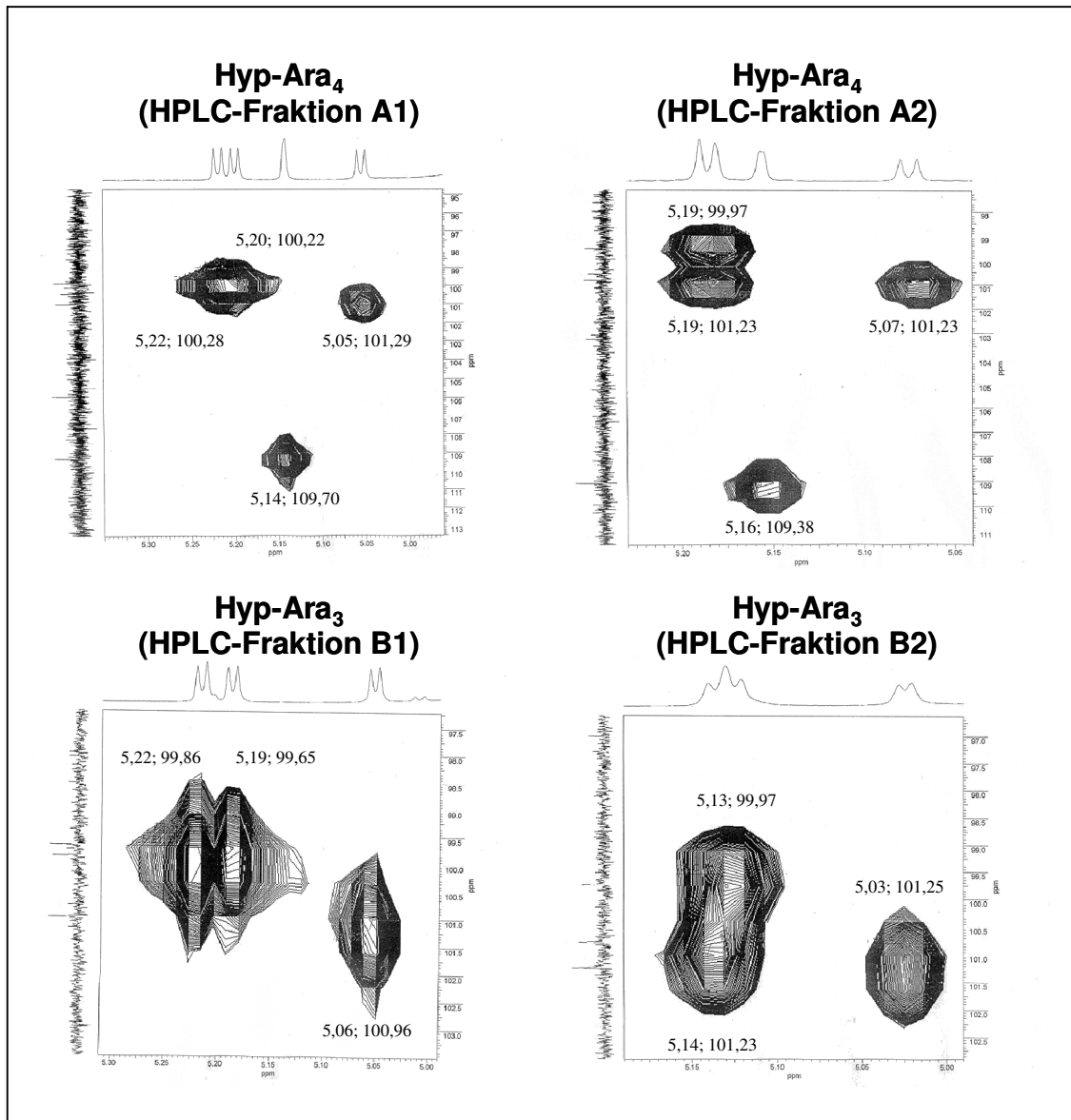
### 2.1.5 NMR-Analysen der *Arabidopsis thaliana* Glykane

Die magnetische Kernresonanzspektrometrie wurde in dieser Arbeit aus zweierlei Gründen verwendet. Zum einen wurden mit ein- bzw. zweidimensionalen NMR-Experimenten die anomeren Konfigurationen der einzelnen Zuckermonomere eines HypGlykans bestimmt. Außerdem wurden selektive  $^1\text{H}$ -NOESY-Experimente durchgeführt, um die Strukturunterschiede der Verbindungen A1/A2 sowie B1/B2 aufzuklären.

Die Schwierigkeit bei der Messung von Kohlenhydraten liegt darin, dass eine Vielzahl räumlich nur gering unterschiedlicher Strukturbereiche eine eindeutige Zuordnung der Atome untereinander nur schwer zulässt. Andererseits ist eine Auswertung aber durchaus in solchen Bereichen leicht durchzuführen, die sich aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften von den restlichen Bereichen unterscheiden. Bei der Untersuchung von Hydroxyprolin gebundenen Glykanen wurden durch ein- und zweidimensionale NMR-Experimente vor allem die räumlichen Orientierungen von Wasserstoff- ( $^1\text{H}$ ) und Kohlenstoffatomen ( $^{13}\text{C}$ ) im Bereich der glykosidischen Bindung und von Hydroxyprolin bestimmt. Die NMR-Messungen wurden von Herrn Dr. Schmickler am Institut für organische Chemie der Universität zu Köln durchgeführt, dem an dieser Stelle mein Dank gilt.

Die ermittelten chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten sind substanzspezifisch. Daher lassen sich die anomeren Konformationen der einzelnen Zuckermonomere eines Hydroxyprolin gebundenen Glykans durch den Vergleich der Ergebnisse mit bekannten Literaturwerten bestimmen [59].

Abbildung 25 zeigt vergleichend die H-C-Korrelationen im Bereich der anomeren Kohlenstoffatome der vier, aus *Arabidopsis* isolierten HypGlykane (Fraktionen A1, A2, B1 und B2).



**Abb. 25:** H-C-Korrelationen im Bereich der glykosidischen Bindungen der vier aus *Arabidopsis thaliana* gereinigten HypGlykane. Die angegebenen Werte beschreiben die chemischen Verschiebungen  $\delta$  durch  $^1\text{H}$ -Atome (erster Wert; X-Achse) und  $^{13}\text{C}$ -Atome (zweiter Wert; Y-Achse) und tragen den Zusatz ppm.

Betrachtet man zunächst die Spektren der beiden Glykane HypAra<sub>3</sub> (Abb. 25 unten), so zeigen die anomeren C-Atome allesamt eine chemische Verschiebung im Bereich von etwa 100 ppm. Die Signale der korrespondierenden Protonen zeigen Duplets mit einer chemischen Verschiebung im Bereich von 5 ppm, alle mit Kopplungskonstanten zwischen 4 und 4,8 Hz (siehe auch nachfolgende Tabelle). Damit liegen die Signale aller Zuckermomere von HypAra<sub>3</sub> im charakteristischen Bereich der  $\beta$ -L-Konformation von Arabinose [59]. Im Falle der beiden größeren Verbindungen HypAra<sub>4</sub> der Fraktionen A1 und A2 (Abb. 25 oben), lässt sich ein weiteres Signal beobachten, dessen  $^{13}\text{C}$ -Verschiebung einen deutlich höheren Wert

von 110 ppm besitzt. Die anomeren Protonen zeigen hier außerdem eine sehr kleine Kopplungskonstante von nur 0,7 Hz. Diese Werte sind charakteristisch für Arabinofuranose in der  $\alpha$ -L-Konformation [59]. Auffallend bei der Betrachtung der vier NMR-Messungen im Bereich der glykosidischen Bindungen ist außerdem, dass jeweils zwei NMR-Signale einer HypAra<sub>3</sub>- und einer HypAra<sub>4</sub>-Verbindung sehr ähnliche chemische Verschiebungen besitzen. So sind zwei der Signale der entsprechenden HypGlykane aus den HPLC-Fraktionen A2 und B2 jeweils übereinander angeordnet (<sup>13</sup>C-Verschiebungen von je 99,97 und 101,23 ppm), während sich die entsprechenden Signale von HypAra<sub>3</sub> und HypAra<sub>4</sub> der HPLC-Fraktionen A1 und B1 kaum in ihrer <sup>13</sup>C-Verschiebung (alle Werte im Bereich von 100 ppm), dafür aber deutlich in ihren <sup>1</sup>H-Verschiebungen unterscheiden und daher nebeneinander angeordnet sind (4,4 und 4,0 Hz bei HypAra<sub>3</sub> beziehungsweise 4,0 und 4,8 Hz bei HypAra<sub>4</sub>). Hier zeigt sich erstmals ein Unterschied in bestimmten NMR-Signalen der jeweils massengleichen Verbindungen (Tabelle 1).

**Tabelle 1:** Chemische Verschiebung von <sup>13</sup>C- und <sup>1</sup>H-Atomen im Bereich der glykosidischen Bindung der vier aus *Arabidopsis* isolierten HypGlykane. Die Werte der chemischen Verschiebung  $\delta$  tragen den Zusatz ppm. Die Kopplungskonstanten J<sub>1,2</sub> tragen die Einheit Hertz [Hz].

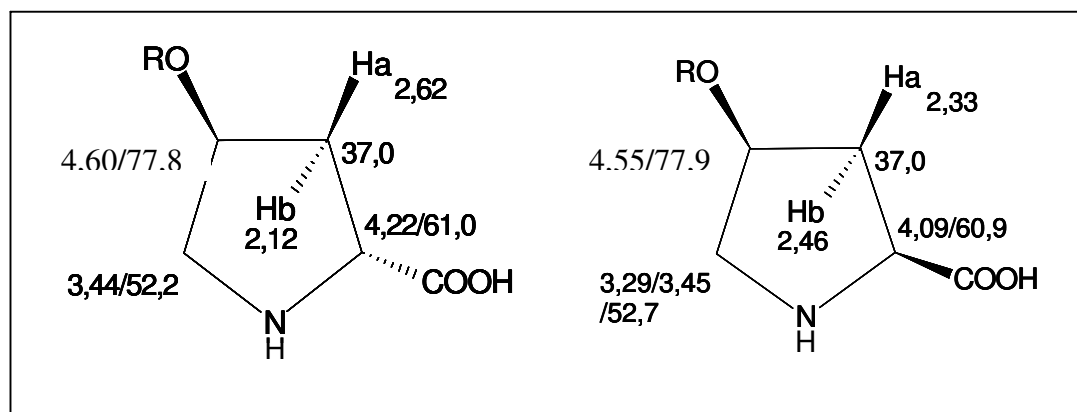
HypGlykan	Arabinoseeinheit	C <sub>1</sub> [ppm]	H <sub>1</sub> [ppm]	J <sub>1,2</sub> [Hz]
HypAra <sub>3</sub> (HPLC-Fraktion B1)	A	99,86	5,22	4,4
	B	99,65	5,19	4,0
	C	100,96	5,06	4,4
HypAra <sub>4</sub> (HPLC-Fraktion A1)	A	100,22	5,20	4,0
	B	100,28	5,22	4,8
	C	101,29	5,05	3,7
	D	109,70	5,14	0,7
HypAra <sub>3</sub> (HPLC-Fraktion B2)	A	99,97	5,13	4,8
	B	101,23	5,14	4,8
	C	101,25	5,03	4,7
HypAra <sub>4</sub> (HPLC-Fraktion A2)	A	99,97	5,19	4,0
	B	101,23	5,19	4,0
	C	101,23	5,07	4,8
	D	109,38	5,16	0,7

Deutlicher wird dieser Unterschied bei der Betrachtung der NMR-Signale im Bereich der Hydroxyprolinreste (Tabelle 2).

**Tabelle 2:**  $^{13}\text{C}$ - und  $^1\text{H}$ -Verschiebungen der Hydroxyprolinreste der beiden HypGlykane der Sequenz HypAra<sub>3</sub> aus den HPLC-Fractionen B1 und B2. Die chemischen Verschiebungen der Grafik und der Tabelle tragen den Zusatz ppm.

HypGlykan	H2	H3	H4	H5	C2	C3	C4	C5
HypAra <sub>3</sub> (HPLC-Fraktion B1)	4,22	2,62 2,12	4,60	3,44	61,0	37,0	77,8	52,2
HypAra <sub>3</sub> (HPLC-Fraktion B2)	4,09	2,33 2,46	4,55	3,29 3,45	61,0	37,0	77,9	52,7

Auffallend ist der große Unterschied der Signale der Hydroxyprolinreste bei der chemischen Verschiebung der beiden Protonen H3a und H3b an Kohlenstoffposition C<sub>3</sub>. Dies könnte auf eine mögliche Cis-Trans-Isomerie in Folge der alkalischen Aufarbeitungsbedingungen hinweisen (Abbildung 26).

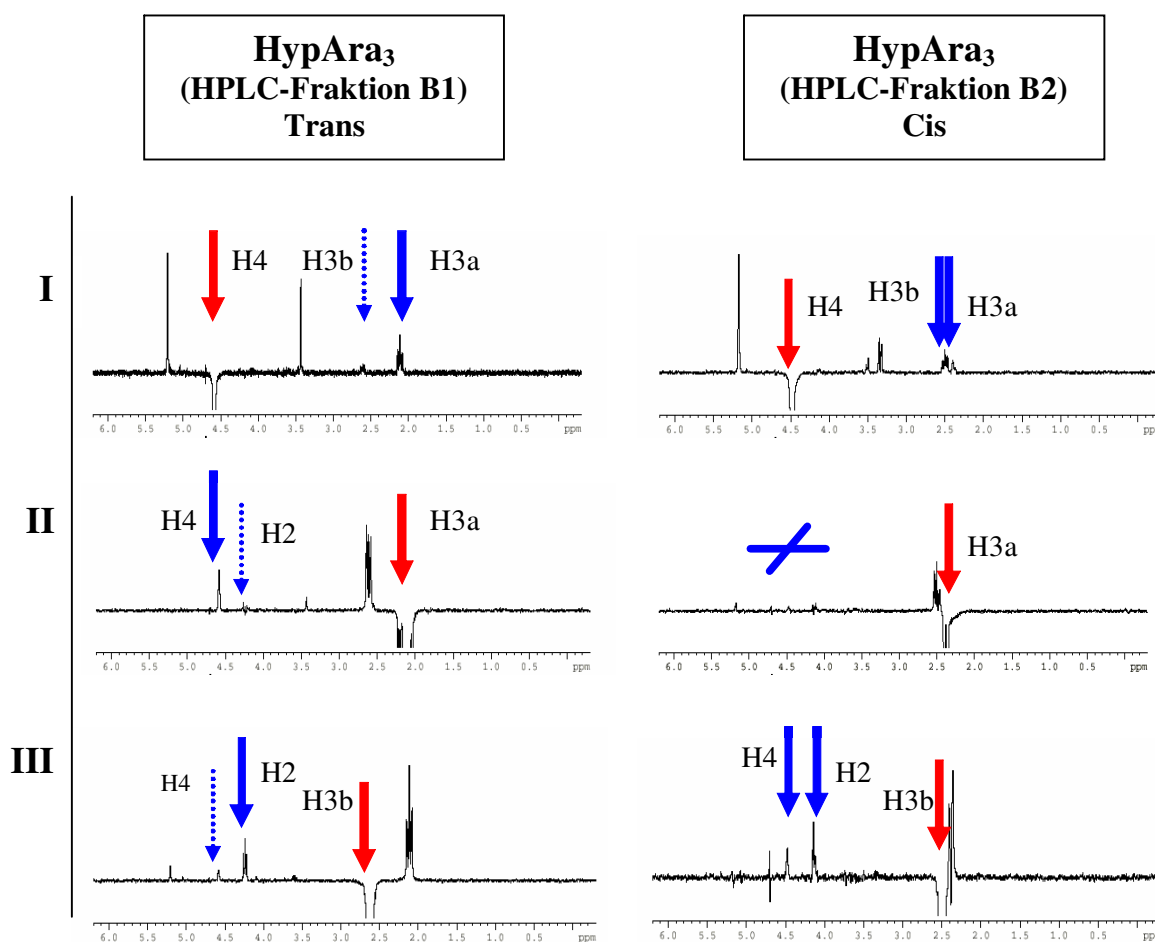


**Abb. 26:** Mögliche Stellungsunterschiede der Hydroxyprolinreste der beiden Verbindungen Hyp-Ara<sub>3</sub> der HPLC-Fractionen B1 und B2. Die Reste R bezeichnen die drei Arabinoseeinheiten der Verbindungen.

Zum Beweis dieser Hypothese wurden von Dr. Schweimer am Zentrum für Biopolymere der Universität Bayreuth selektive eindimensionale NOESY-Experimente durchgeführt (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy).

Bei der NOESY führt die magnetische Stimulation selektierter Atomkerne zu einem distanzabhängigen Energietransfer der angeregten Kerne zu Atomen in unmittelbarer räumlicher Umgebung (Distanz < 0,5 nm, siehe Schema in Kapitel 4.6.2).

In Abbildung 27 -I, -II und -III sind vergleichend die NOESY-Experimente der zwei Glykane der Sequenzfolge HypAra<sub>3</sub> der HPLC-Fractionen B1 und B2 graphisch zusammengefasst.



**Abb. 27:** NOESY-Experimente von HypAra<sub>3</sub> aus den HPLC-Fractionen B1 und B2. Gezeigt ist der Energietransfer bestimmter angeregter Wasserstoffatome der Hydroxyprolinreste beider Glykane hin zu benachbarten Wasserstoffatomen in Abhängigkeit der räumlichen Distanz. Rot markiert ist die Position der Energieeinstrahlung. Blau markiert sind die Signalpositionen. Die gestrichelten Pfeile kennzeichnen Signale mit vergleichsweise geringerer Intensität.

Bei der Verbindung aus HPLC-Fraktion B1 zeigt ein Energieinput im Bereich von H4 (bei 4,6 ppm) einen deutlich stärkeren NOE zu H3a (etwa 2,1 ppm) als zu H3b (etwa 2,6 ppm) (Abb. 27-I). Von den beiden Protonen an C3 zeigt H3a einen stärkeren NOE auf H4, während H3b einen stärkeren NOE auf H2 zeigt (Abb. 27-II und -III). Somit handelt es sich bei

HypAra<sub>3</sub> aus HPLC-Fraktion B1 um ein 2,4 Trans-Hydroxyprolin gebundenes Glykan. Bei der zweiten Struktur aus HPLC-Fraktion B2 sind die Resonanzen der beiden Protonen an C3 nicht gut getrennt, wodurch eine selektive Anregung über H4 kaum gelingt (Abb. 27-I). Bei dieser Verbindung zeigt eines der beiden Protonen von C3, H3a (2,4 ppm) keinen nennenswerten NOE sowohl auf H2 als auch auf H4 (Abb. 27-II). Das andere Proton, H3b (etwa 2,55 ppm) zeigt dagegen einen deutlichen NOE auf H4 und auf H2 (Abb. 27-III). Damit lässt sich diese Verbindung als 2,4 Cis-Hydroxyprolin gebundenes Glykan bestimmen.

Die Ergebnisse der magnetischen Kernresonanzspektrometrie beweisen damit die von Tan vorgeschlagene Cis-Trans Isomerie an Hydroxyprolin und erklären so auch das unterschiedliche chromatographische Laufverhalten der massegleichen Verbindungen [54].

### 2.1.6 Zusammenfassung des Kapitels

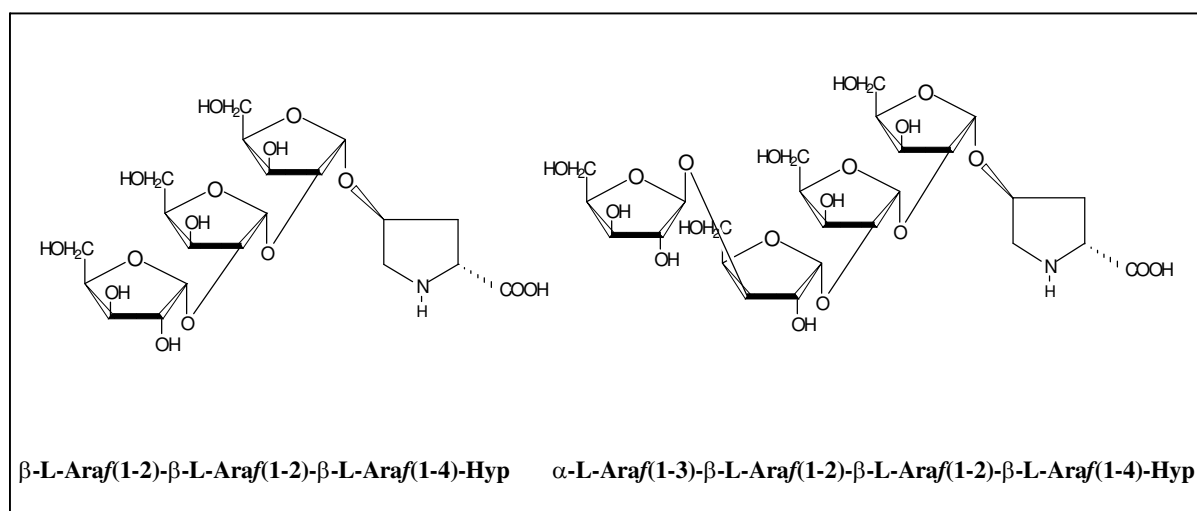
Die Hydroxyprolin gebundenen Glykane aus *Arabidopsis thaliana* wurden zunächst durch alkalische Hydrolyse der Proteine freigesetzt und anschließend über Kationenaustauschchromatographie und HPLC gereinigt. Dabei konnten vier Glykane in Reinfraction gewonnen werden, die anschließend massenspektrometrisch, gaschromatographisch und durch magnetische Kernresonanzspektrometrie analysiert wurden. Durch ESI-MS Analysen wurde zunächst festgestellt, dass es sich bei den vier Verbindungen um jeweils zwei Paare gleicher Masse und gleicher Sequenzfolge von Hyp(Pentose)<sub>3</sub> und Hyp(Pentose)<sub>4</sub> handelt. Die gaschromatographische Analyse der nach saurer Hydrolyse erhaltenen Zuckermonomere zeigte, dass ausschließlich die Arabinose zum Aufbau der Verbindungen verwendet wird. Die exakten Verknüpfungspositionen der Arabinosemonomere untereinander wurden mit Hilfe von Methylierungsanalysen ermittelt. Hierbei zeigte sich, dass die jeweils ersten beiden Arabinoseeinheiten aller vier HypGlykane 1,2 verbunden vorliegen sind. Die beiden HypGlykane der Sequenz HypAra<sub>4</sub> tragen darüber hinaus eine 1,3 verbundene Arabinoseeinheit. Terminal tragen alle vier Verbindungen Arabinoseeinheiten mit der Verknüpfungsposition 1.

Durch magnetische Kernresonanzspektrometrie wurden schließlich die anomeren Konformationen der einzelnen Arabinosebausteine bestimmt. Die H-C-Korrelationen im Bereich der glykosidischen Bindungen der vier Glykane zeigen, mit Ausnahme der terminalen Arabinoseeinheiten der beiden Verbindungen HypAra<sub>4</sub>, dass alle Arabinofuranosen der Verbindungen



in  $\beta$ -L-Konformation vorliegen. Die terminalen Einheiten der beiden größeren Verbindungen liegen dagegen  $\alpha$ -L konfiguriert vor. Die Messung der H-C-Korrelation der HypGlykane im Bereich des Aglykons Hydroxyprolin ergibt schließlich einen ersten Hinweis auf eine Cis-Trans Isomerie der massengleichen Glykane an Hydroxyprolin. Durch mehrere selektive  $^1\text{H}$ -NOESY- Experimente gelingt der Beweis dieser Hypothese.

In Abbildung 28 werden die Ergebnisse dieses Kapitel graphisch zusammengefasst und die trans-Hydroxyprolin gebundenen Glykane HypAra<sub>3</sub> und HypAra<sub>4</sub> aus *Arabidopsis thaliana* dargestellt.



**Abb. 28:** Hydroxyprolin gebundene Glykane HypAra<sub>3</sub> und HypAra<sub>4</sub> aus *Arabidopsis thaliana*.

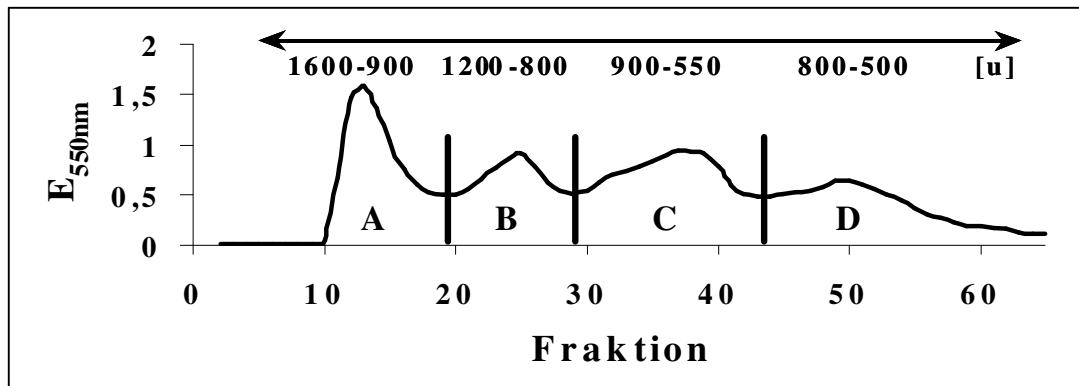
## 2.2 Lineare Hydroxyprolin gebundene Glykane aus *Chlamydomonas reinhardtii*

Im Gegensatz zu den verhältnismäßig einfach aufgebauten HypGlykanen HypAra<sub>3</sub> und HypAra<sub>4</sub> aus *Arabidopsis* zeigen die entsprechenden HypGlykane aus *Chlamydomonas* eine wesentlich höhere Varianz bezüglich ihrer Kettenlänge und der Verknüpfung der Zuckermomere untereinander. Miller konnte 1972 zeigen, dass Hydroxyprolin gebundene Glykane der Grünalge im Gegensatz zu den Glykanstrukturen der Extensine höherer Pflanzen (*Arabidopsis*) neben Arabinose auch Galaktose und zu geringeren Anteilen auch Glukose als Kettenbausteine besitzen [49]. Kilz nutzte im Jahre 2002 die von ihm entwickelte HPLC-MS-Methode zur strukturellen Beschreibung von etwa 20 verschiedenen HypGlykanen der *Chlamydomonas* Wandproteine mit einer Kettenlänge von einem bis hin zu elf Zuckermomeren [50,53]. Kilz stellte bei seinen Untersuchungen auch fest, dass einzelne dieser Monomere selber durch Methylierung modifiziert vorliegen. Aufbauend auf diesen Arbeiten wurde zunächst versucht, die Trennungen für die präparative Reinigung von kürzeren linearen HypGlykanen auszuarbeiten, um diese möglichst vollständig zu beschreiben.

### 2.2.1 Reinigung von Hydroxyprolin gebundenen Glykanen aus *Chlamydomonas reinhardtii*

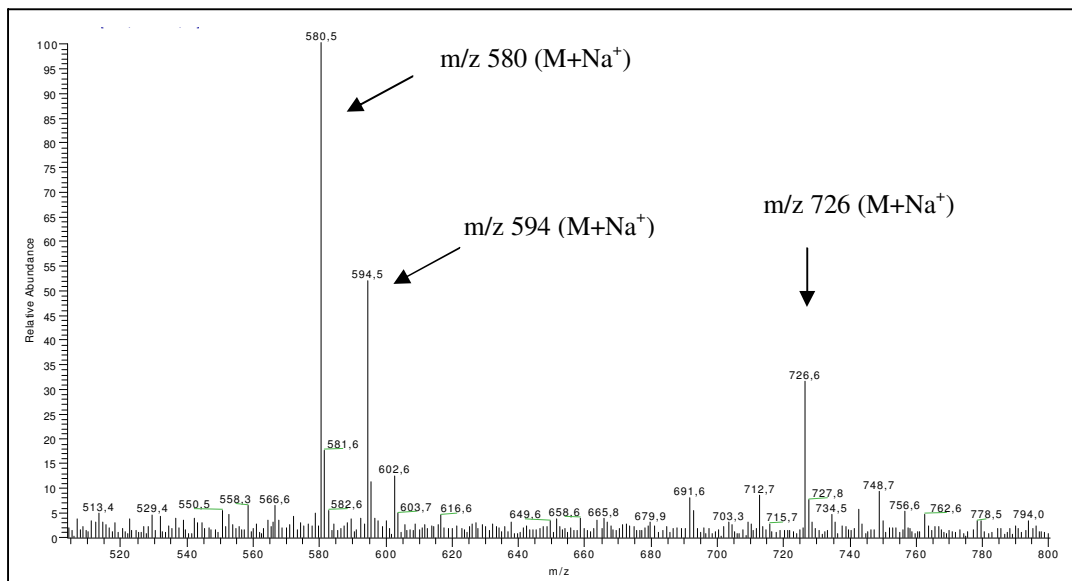
Zur präparativen Gewinnung von HypGlykanen aus Glykoproteinen der äußeren Zellwand von *Chlamydomonas* wurden etwa 200 Liter einer dicht gewachsenen Algenkultur verarbeitet. Im Gegensatz zu den quervernetzten Extensinen höherer Pflanzen sind die Glykoproteine der äußeren Zellwand der Grünalge ausschließlich durch sekundäre Wechselwirkungen in das Grundgerüst der inneren Zellwand eingebettet und lassen sich daher durch chaotrope Lösungen von den restlichen Zellbestandteilen trennen (Kapitel 1.5). Durch die Behandlung mit Natriumperchloratlösung sowie anschließender Dialyse und Lyophilisation konnten so bei jeder Aufarbeitung etwa 3 g Glykoprotein-Rohextrakt (Trockengewicht) gewonnen werden (Kapitel 4.1). Der Rohextrakt wurde anschließend in einer 0,44 N Bariumhydroxidlösung über einen Zeitraum von 20 Stunden unter Rückfluss gekocht und durch Zugabe von 2 N Schwefelsäure neutralisiert. Dabei entstehendes schwerlösliches Bariumsulfat lässt sich durch Zentrifugation entfernen.

Durch Kationenaustauschchromatographie an Aminex-Material (Biorad®) wurden die durch die Alkalibehandlung freigesetzten Glykane, ebenso wie für *Arabidopsis* in Kapitel 2.1 beschrieben, zunächst vorfraktioniert. Abbildung 29 zeigt hierzu die Aminex-Kationenaustauschchromatographie einer *Chlamydomonas* Zellwandpräparation.



**Abb. 29:** Kationenaustauschchromatographie eines alkalischen Hydrolysates von 3 g Rohextrakt aus *Chlamydomonas reinhardtii*. Die Bestimmung des Hydroxyprolinegehaltes einer Fraktion erfolgte nach Kivirikko [52]. Gezeigt ist der gleitende Durchschnitt der Einzelmessungen. Die Massenbereiche wurden über ESI-MS-Experimente ermittelt.

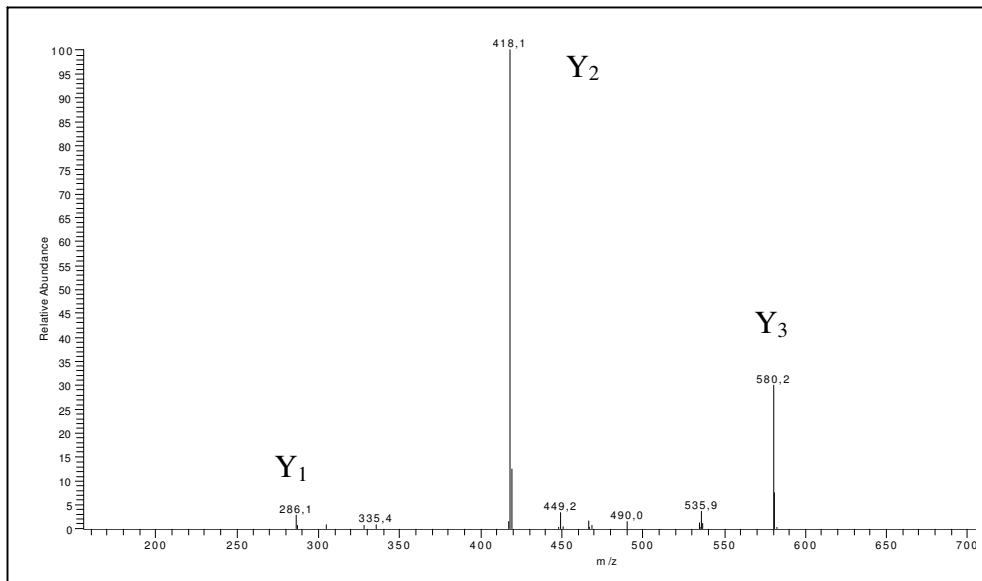
Das Chromatogramm erlaubt eine Einteilung in die Signalbereiche A, B, C und D, die jeweils vereinigt, neutralisiert und über P2-Chromatographie entsalzt und danach getrennt weiter untersucht wurden. Die massenspektrometrische Analyse (ESI-MS) dieser vier Signalbereiche sollte nun zunächst einen Überblick über die Größenbereiche und die Komplexität der in den Fraktionen enthaltenen HypGlykane Aufschluss geben. Die entsprechenden Massenbereiche sind in der Grafik bereits enthalten. Abbildung 30 zeigt hierzu exemplarisch die massenspektrometrische Analyse von Aminex-Fraktion D.



**Abb. 30:** ESI-Gesamtspektrum von Aminexfraktion D eines Rohextrakthydrolysates aus *Chlamydomonas reinhardtii*. Zu sehen sind die Ionenspuren von HypGlykanen in relativer Intensität zum Verhältnis Masse zu Ladung [m/z].

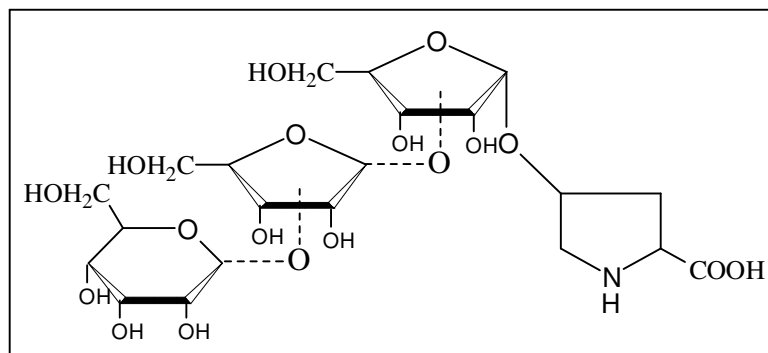
Zu sehen sind hier die Ionenspuren Hydroxyprolin gebundener Glykane in einem Massenbereich von 500 bis 800 u. Als Hauptbestandteile der Fraktion lassen sich die drei Verbindungen der Massen 557 u ( $m/z$  580  $M+Na^+$ ), 571 u ( $m/z$  594  $M+Na^+$ ) und 703 u ( $m/z$  726  $M+Na^+$ ) beobachten. Als Nebenbestandteile zeigt die massenspektrometrische Analyse aber auch Ionenspuren bei  $m/z$  602,  $m/z$  712 und  $m/z$  748.

Zur Identifizierung Hydroxyprolin gebundener Glykane und zur Bestimmung ihrer Sequenz wurden alle beobachteten Ionen der Aminexfraktionen, wie für die *Arabidopsis* Zucker vorgestellt, über ESI-MS<sup>n</sup>-Experimente weiter untersucht. Abbildung 31 zeigt hierzu exemplarisch die ESI-MS<sup>2</sup>-Fragmentierung eines der in Aminex-Fraktion D enthaltenen HypGlykane einer Masse von 557 u (580  $M+Na^+$ ).



**Abb. 31:** ESI-MS<sup>2</sup>-Fragmentierung eines linearen HypGlykans der Masse 580 u (M+Na<sup>+</sup>).

Die Fragmentierung zeigt die charakteristischen Ionen der Y-Serie dieses Glykans. Die Abspaltung von Einheiten der Masse 162 u und 132 u (Fragment-Ionen bei m/z 418 und m/z 286) zeigen den Verlust einer terminalen Hexoseeinheit und einer Pentoseeinheit und führen auf ein Fragmention zurück, das sich durch sein m/z-Verhältnis von 286 als Natriumaddukt von Hydroxyprolin verbunden mit einer Pentoseeinheit erklären lässt. Durch die Akkumulation der Ionenspur bei m/z 286 und der Stoßfragmentierung dieses Ions kann bei allen an Hydroxyprolin gebundenen Glykanen das Aglykon Hydroxyprolin selber in einem Verhältnis m/z von 154 (M+Na<sup>+</sup>) oder 132 (M+H<sup>+</sup>) ermittelt werden (ohne Darstellung). Die Fragmentierungsexperimente belegen demnach insgesamt ein lineares Hydroxyprolin gebundenes Glykan der nachfolgend skizzierten Sequenzfolge (Abbildung 32).



**Abb. 32:** Sequenzfolge eines Hydroxyprolin gebundenen Glykans mit einer Masse von 557 u.

Die weiteren Hauptbestandteile von Fraktion D und die Hydroxyprolin gebundenen Glykane der drei weiteren Aminex-Fractionen A-C wurden ebenso massenspektrometrisch beschrieben und sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Einige der dargestellten Verbindungen enthalten einen methylierten Zucker, der an seiner charakteristischen Massendifferenz von 14 u erkannt wurde. Die Tabelle enthält die Sequenzfolgen Hydroxyprolin gebundener Glykane bis zu einem Molekulargewicht von 733 u. Bei der ESI-MS Analyse der größeren Verbindungen der Aminex-Fractionen A und B wird methodisch bedingt meist nur ein Teil der theoretischen Fragmentationen beobachtet, so dass eine eindeutige Sequenzfolge der einzelnen Monomereinheiten für diese Verbindungen nicht zu ermitteln war. Diese größeren Verbindungen werden in der Tabelle anhand ihrer Monomerzusammensetzung aus Pentose- und Hexoseeinheiten sowie ihrer methylierten Derivate beschrieben.

**Tabelle 3:** Glykane der Zellwand von *Chlamydomonas reinhardtii* und ihre Monomerzusammensetzung. C<sub>5</sub> =Pentose, C<sub>6</sub> =Hexose, Me =Methylgruppe.

Aminex-Fraktion	Molekulargewicht			Glykansequenz oder Monomerzusammensetzung
	(u)	(M+H <sup>+</sup> )	(M+Na <sup>+</sup> )	
D	557	558	580	Hyp-C <sub>5</sub> -C <sub>5</sub> -C <sub>6</sub>
D	571	572	594	Hyp-C <sub>5</sub> -C <sub>5</sub> -C <sub>6</sub> -Me
D,C	689	690	712	Hyp-C <sub>5</sub> -C <sub>5</sub> -C <sub>6</sub> -C <sub>5</sub>
D,C	703	704	726	Hyp-C <sub>5</sub> -C <sub>5</sub> -C <sub>6</sub> -C <sub>5</sub> -Me
C,B	719	720	742	Hyp-C <sub>5</sub> -C <sub>5</sub> -C <sub>6</sub> -C <sub>6</sub>
C,B	733	734	756	Hyp-C <sub>5</sub> -C <sub>5</sub> -C <sub>6</sub> -C <sub>6</sub> -Me
B	821	822	844	Hyp + 4C <sub>5</sub> + 1 C <sub>6</sub>
B	851	852	874	Hyp + 3C <sub>5</sub> + 2C <sub>6</sub>
B	865	866	888	Hyp + 3C <sub>5</sub> + C <sub>6</sub> + C <sub>6</sub> -Me
B,A	983	984	1006	Hyp + 4C <sub>5</sub> + 2C <sub>6</sub>
B,A	1043	1044	1066	Hyp + 2C <sub>5</sub> + 4C <sub>6</sub>
A	1115	1116	1138	Hyp + 5C <sub>5</sub> + 2C <sub>6</sub>
A	1129	1130	1152	Hyp + 4C <sub>5</sub> + 2C <sub>6</sub> + C <sub>5</sub> -Me
A	1291	1292	1314	Hyp + 4C <sub>5</sub> + 3C <sub>6</sub> + C <sub>5</sub> -Me
A	1307	1308	1330	Hyp + 4C <sub>5</sub> + 4C <sub>6</sub>
A	1453	1454	1476	Hyp + 4C <sub>5</sub> + 4C <sub>6</sub> + C <sub>5</sub> -Me
A	1483	1484	1506	Hyp + 3C <sub>5</sub> + 5C <sub>6</sub> + C <sub>5</sub> -Me
A	1615	1616	1638	Hyp + 4C <sub>5</sub> + 5 C <sub>6</sub> + C <sub>5</sub> -Me
A	1645	1646	1668	Hyp + 3C <sub>5</sub> + 6C <sub>6</sub> + C <sub>5</sub> -Me

Die Tabelle deckt sich weitgehend mit den Daten die Kilz im Rahmen seiner Dissertation gewinnen konnte [53], zeigt aber eine weitere Auffälligkeit. Alle HypGlykane, die über ihre charakteristischen Ionenspuren dem Aglykon Hydroxyprolin zugeordnet werden, tragen, ebenso wie bereits zuvor für die Glykane HypAra<sub>3</sub> und HypAra<sub>4</sub> aus höheren Pflanzen beschrieben, zwei an Hydroxyprolin gebundene Pentoseeinheiten. Auch bei den nur über ihre Monomerzusammensetzung beschriebenen größeren Verbindungen zeigen sich bei der ESI-MS-Stoßaktivierung die charakteristischen Fragmentionen bei  $m/z$  286 ( $M+Na^+$ ) und  $m/z$  418 ( $M+Na^+$ ).

Daneben ergeben die Untersuchungen der Aminex-Fractionen A-D dieser *Chlamydomonas* Zellwandpräparation eine weitere Besonderheit. So wurde neben den bekannten Hydroxyprolin gebundenen Glykanen eine zweite Klasse bislang unbekannter Verbindungen gefunden, die sich durch unterschiedliche Stoßfragmentierungen von den zuvor dargestellten Verbindungen unterscheiden. Abbildung 33 zeigt hierzu ESI-MS-Fragmentierungsexperimente einer dieser unbekannten Glykanstrukturen mit einem  $m/z$ -Verhältnis von 602 u aus Aminex-Fraktion D.

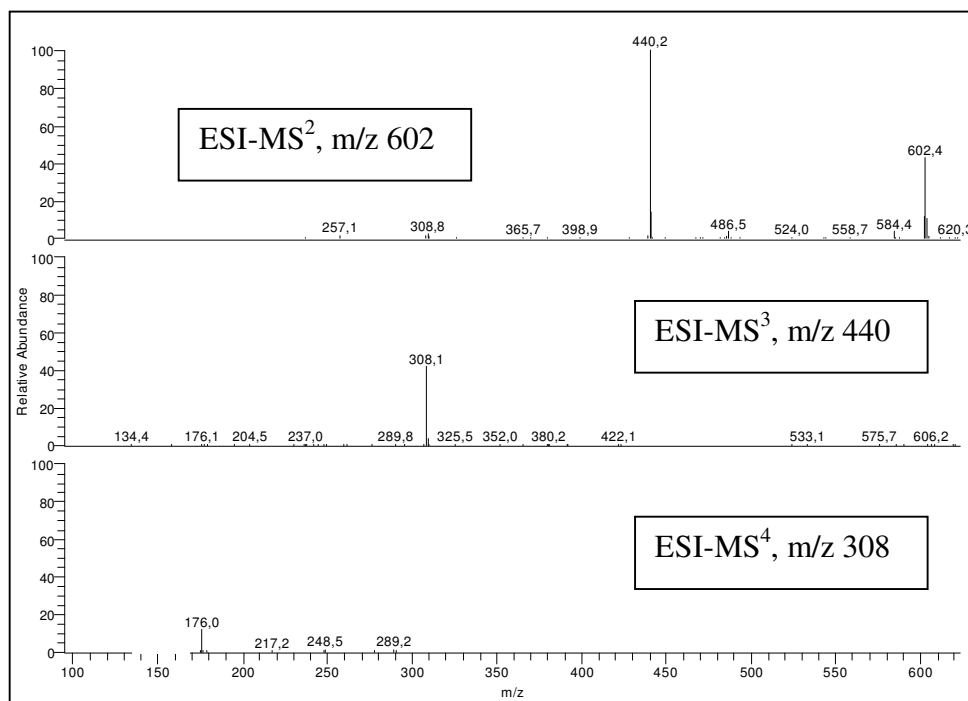


Abb. 33: ESI-MS<sup>n</sup>-Stoßexperimente einer Glykanstruktur bei  $m/z$  602 u.

Die Abbildung zeigt zunächst auch bei dieser Verbindung über die Ionenspuren bei  $m/z$  440,  $m/z$  308 und  $m/z$  176 den für HypGlykane aus *Chlamydomonas* charakteristischen Verlust einer Hexoseeinheit (162 u) und zweier Pentoseeinheiten (jeweils 132 u) vom Gesamtmolekül, fragmentiert aber letztlich auf ein unbekanntes Fragmentation bei  $m/z$  176 u zurück. Dieses Ion ist charakteristisch für eine Reihe von untersuchten Verbindungen, kann aber weder Hydroxyprolin noch einer anderen Standardamino­säure zugeordnet werden. Die Frage, welches Aglykon diese Verbindungen tragen, muss aufgrund des geringen Anteils dieser Glykane an der Gesamtmasse offen bleiben. In Tabelle 4 sind alle Verbindungen, die bei der ESI-MS-Stoßfragmentierung das unbekannte Fragmentation bei  $m/z$  176 zeigen, zusammengefasst.

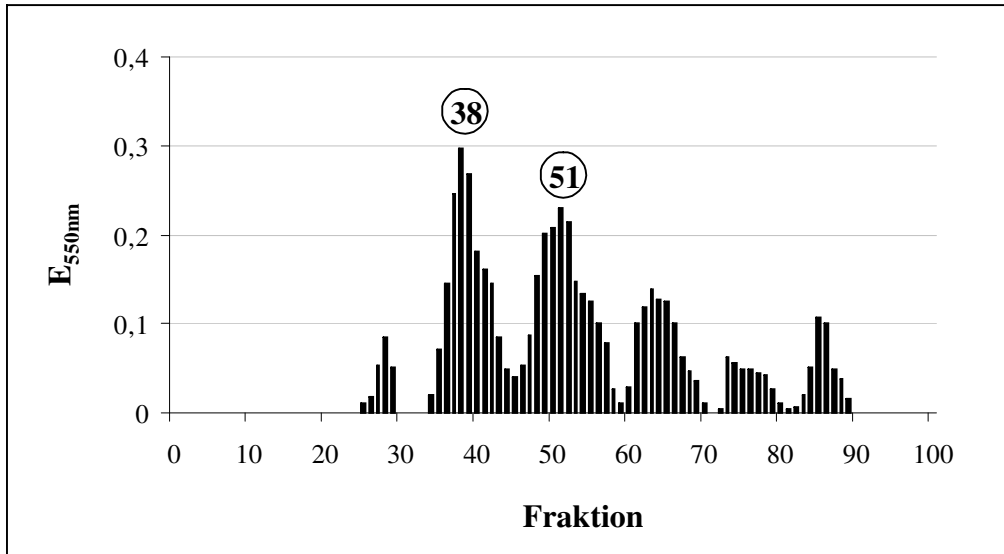
**Tabelle 4:** Unbekannte Glykane der äußeren Zellwand von *Chlamydomonas reinhardtii*.

Aminex-Fraktion	Ionenspur
D	$m/z$ 602
C	$m/z$ 748
B	$m/z$ 910
B	$m/z$ 1020
A	$m/z$ 1182
A	$m/z$ 1492

### 2.2.2 HPLC-Trennung zur Gewinnung von Reinfractionen

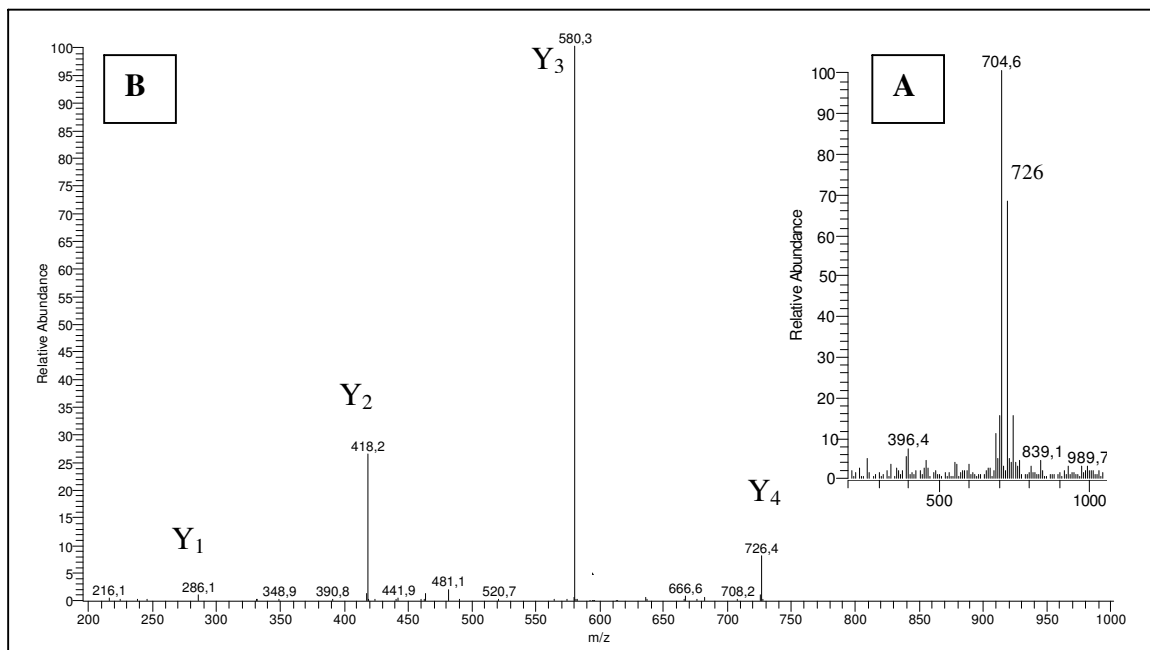
Zur Darstellung von Reinfractionen einzelner Hydroxyprolin gebundener Glykane wurden die Aminex-Fractionen C und D verwendet. Diese Fractionen enthalten nur wenige dominante Vertreter von kürzeren, linearen Hydroxyprolin gebundenen Glykanen und eignen sich daher zur präparativen Trennung. Die Reinigung erfolgte wie in Kapitel 4.1.10 beschrieben an einer HPLC-Aminopropylphase. Abbildung 34 zeigt das Elutionsprofil der HPLC-Trennung von Aminex-Fraktion C der *Chlamydomonas* Aufarbeitung.





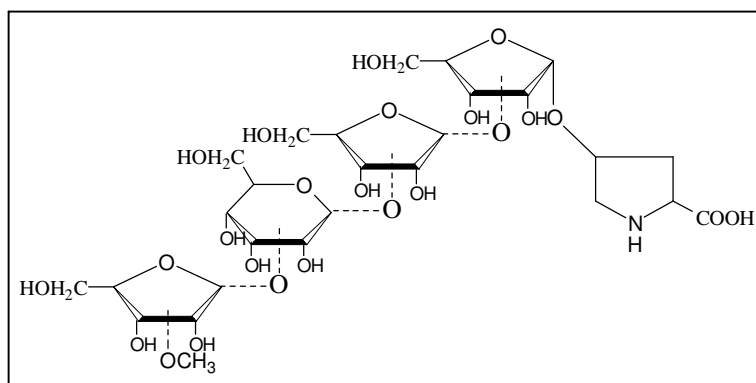
**Abb. 34:** HPLC-Trennung von HypGlykanen des Größenbereiches von 550-900 u aus Aminex-Fraktion C der *Chlamydomonas* Aufarbeitung. Die dominanten Signale um Fraktion 38 und 51 sind im Text erläutert.

Zu sehen sind mehrere Signalbereiche, die zunächst massenspektrometrisch (ESI-MS) untersucht wurden. Die beiden dominanten Signalbereiche mit den Signalspitzen bei Fraktion 38 und Fraktion 51 enthalten beide jeweils ein angereichertes HypGlykan einer Masse von 703 u ( $m/z$  704  $M+H^+$ ;  $m/z$  726  $M+Na^+$ ) (Abbildung 35-A).



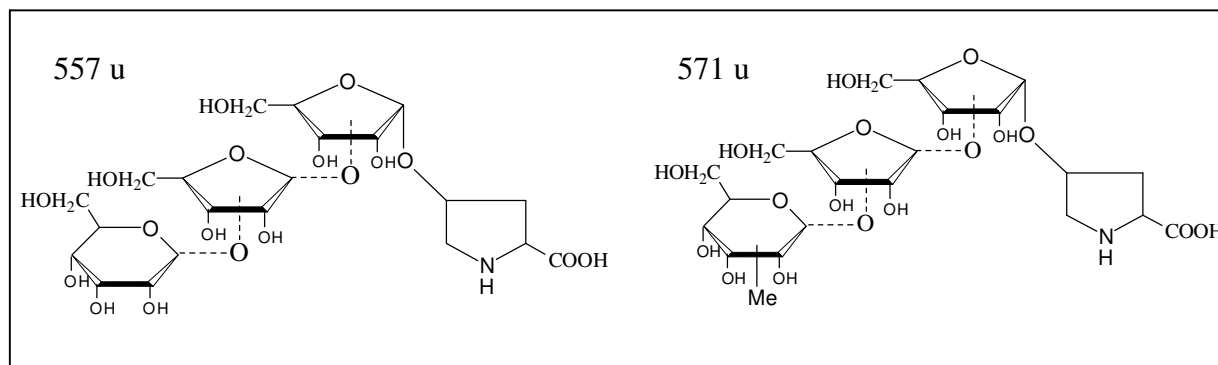
**Abb. 35:** MS-Gesamtspektrum (A) und MS<sup>2</sup>-Analyse (B) von HPLC-Fraktion 51 aus Aminex-Fraktion C.

Die Fragmentierung der beiden HypGlykane durch ESI-MS<sup>2</sup>-Stoßexperimente zeigt die für diese Verbindungen charakteristischen Verluste von einer methylierten terminalen Pentoseeinheit (Y<sub>3</sub>), einer Hexoseeinheit (Y<sub>2</sub>) und einer weiteren Pentoseeinheit (Y<sub>1</sub>), wobei sich das Molekülion bei m/z 286 wiederum als Natriumaddukt einer mit Hydroxyprolin verbundenen Pentoseeinheit erklären lässt (Abbildung 35-B). Daraus ergibt sich die für die isolierten HypGlykane einer Masse von 703 u die nachfolgend dargestellte Sequenzfolge.



**Abb. 36:** Sequenzfolge eines linearen HypGlykans einer Masse von 703 u aus *Chlamydomonas reinhardtii*.

Auf die gleiche Art und Weise wurden dominante Hydroxyprolin gebundene Glykane aus Aminex-Fraktion D präparativ angereichert. Es handelt sich hierbei um zwei massengleiche Verbindungen mit einem Molekulargewicht von 557 u sowie einem weiteren HypGlykan einer Masse von 571 u. Ein isobares HypGlykan der Masse 571 u wurde ebenfalls detektiert, war jedoch nicht klar getrennt und stand daher für die nachfolgende Analytik nicht zur Verfügung. Die aus Aminex-Fraktion D präparativ erhaltenen Glykane sind nachfolgend dargestellt. Die zur Analyse durchgeführten ESI-MS<sup>n</sup>-Stoßexperimente sind dem Anhang ab Seite 148 zu entnehmen.

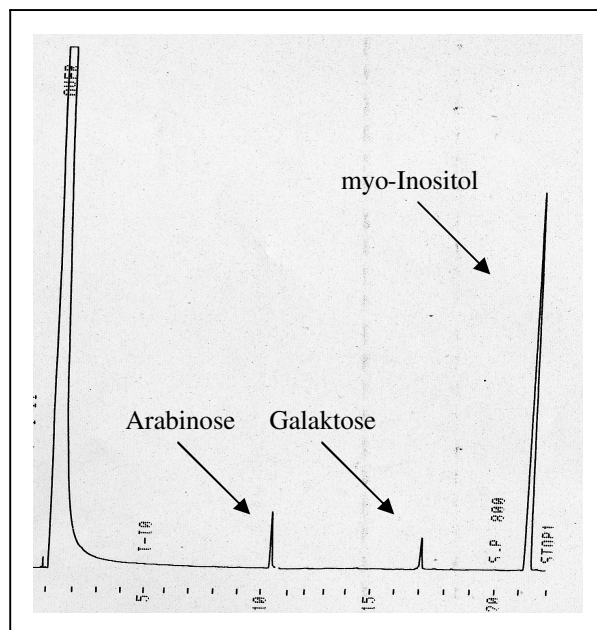


**Abb. 37:** Sequenzfolgen der durch ESI-MS<sup>n</sup>-Experimente beschriebenen HypGlykane der Massen von 557 u (links) und 571 u (rechts) aus Aminex-Fraktion D einer *Chlamydomonas* Zellwandpräparation.

Alle fünf als Reifraktion erhaltenen Hydroxyprolin gebundenen Glykane wurden anschließend gaschromatographisch durch Methylierungsanalyse und magnetische Kernresonanzspektroskopie untersucht.

### 2.2.3 Gaschromatographische Analyse der HPLC-Fractionen

Zur Bestimmung der Zuckerbestandteile der gereinigten HypGlykane aus *Chlamydomonas*, wurden die Verbindungen wie zuvor für *Arabidopsis* beschrieben, hydrolysiert, reduziert und silyliert. Die Messung der resultierenden Zuckeralditole zeigte dabei für alle fünf Glykane vergleichbare Ergebnisse. Abbildung 38 zeigt exemplarisch die gaschromatographische Analyse eines der beiden Hydroxyprolin gebundenen Glykane einer Masse von 557 u (Hyp(Pentose)<sub>2</sub>Hexose).

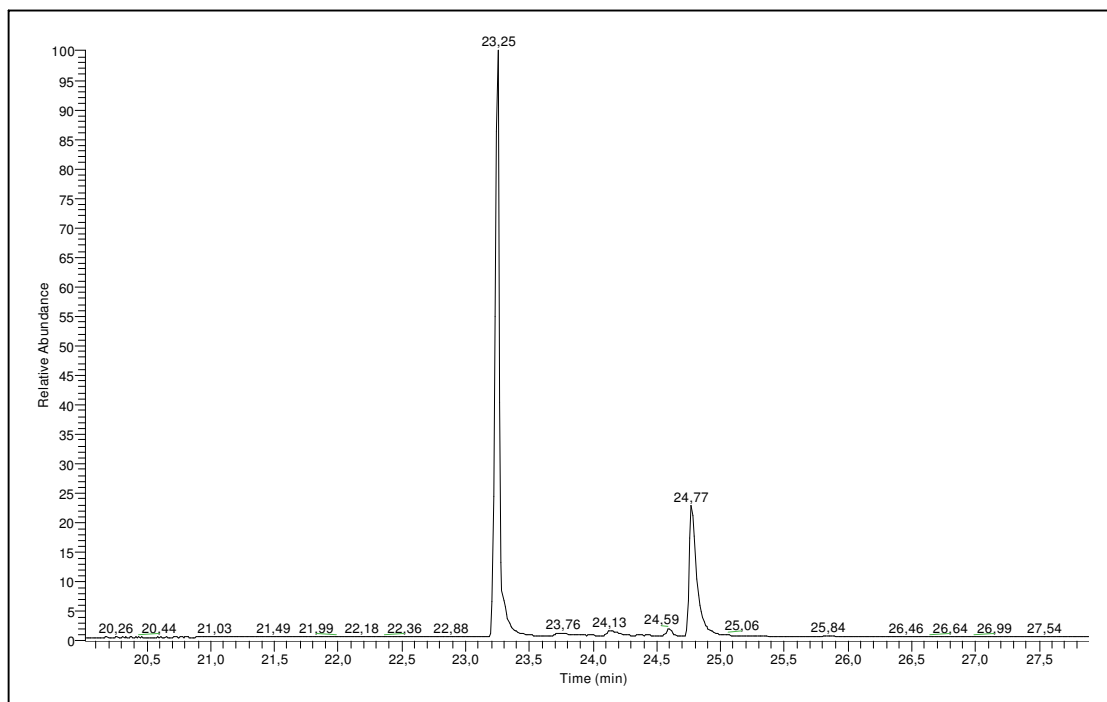


**Abb. 38:** GC-Analyse eines Hydroxyprolin gebundenen Glykans einer Masse von 557 u aus Aminex-Fraktion D.

Das Chromatogramm zeigt neben dem internen Standard myo-Inositol die Zucker Arabinose und Galaktose in einem Signalfächenverhältnis von 2:1. Damit ergibt sich für das HypGlykan der Masse von 557 u, nach gaschromatographischer und massenspektrometrischer Analyse, die Sequenz HypAra<sub>2</sub>Gal. Auch bei der Analyse der anderen isolierten Verbindungen werden ausschließlich Arabinose und Galaktose, mit den nach der MS-Analyse erwarteten Signalfächenverhältnissen, beobachtet (Anhang Seite 171).

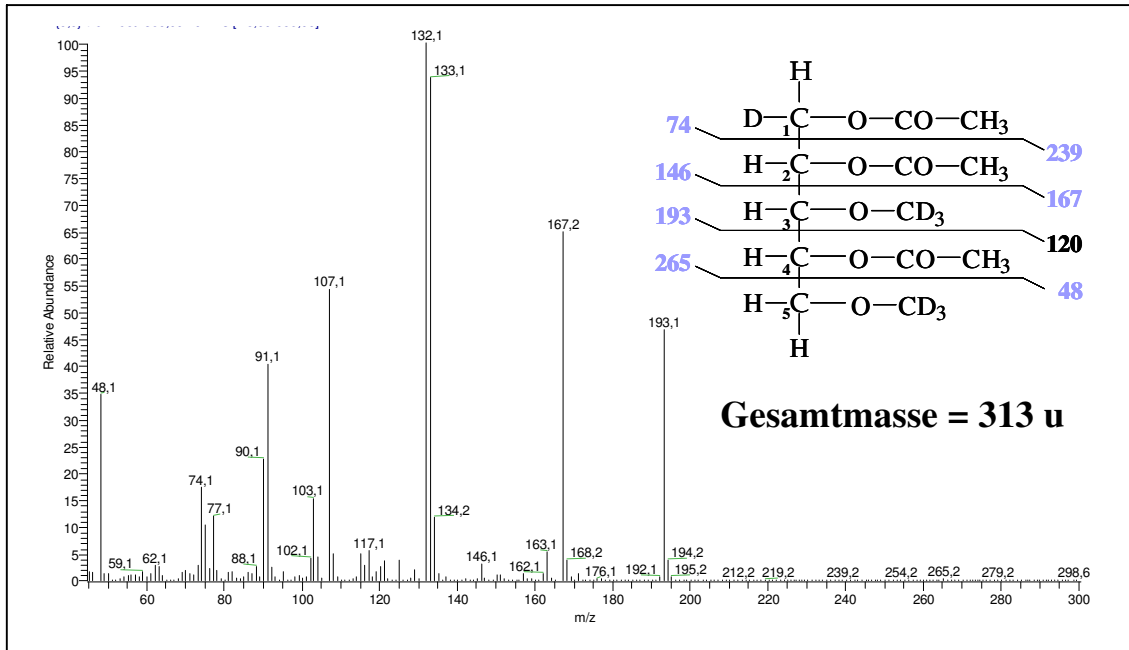
## 2.2.4 Methylierungsanalyse der Reinfractionen

Zur Bestimmung der Verknüpfungspositionen der Zuckermonomere wurden die isolierten Glykane, wie in Kapitel 2.1.4 vorgestellt, in Form ihrer partiell perdeuteromethylierten, partiell acetylierten Zuckeralditole über GC-MS untersucht. Abbildung 39 zeigt hierzu die gaschromatographische Trennung der Derivate, die nach entsprechender Aufarbeitung der zuvor dargestellten Verbindung HypAra<sub>2</sub>Gal beobachtet wurden.



**Abb. 39:** Gaschromatogramm zur Methylierungsanalyse von HypAra<sub>2</sub>Gal aus Aminex-Fraktion D.

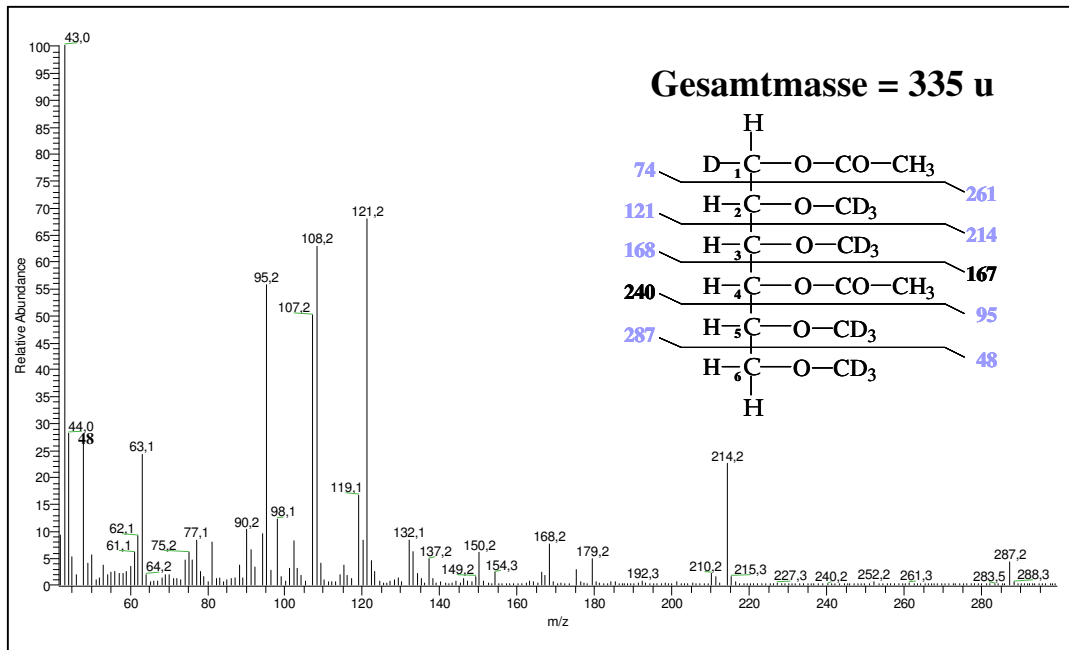
Das Chromatogramm zeigt die beiden Signale mit den Retentionszeiten von 23,25 und 24,77 Minuten. Das Signalfächenverhältnis dieser beiden Signale von etwa 2:1 stimmt dabei mit dem bisherigen Ergebnis überein, dass sich dieses Glykan aus zwei kettenständigen Arabinoseeinheiten und einer terminal verbundenen Galaktoseeinheit zusammensetzt. Darüber hinaus zeigt das gaschromatographische Auftreten von nur zwei Signalen, dass beide Arabinosemonomere die gleichen Verknüpfungspositionen tragen. Betrachtet man hierzu die EI-Fragmentierung zum Zeitpunkt des größeren gaschromatographischen Signals bei einer Retentionszeit von 23,25 Minuten, so lassen sich die Verknüpfungspositionen der beiden Arabinoseeinheiten ermitteln (Abbildung 40).



**Abb. 40:** EI-Fragmentierung bei 23,25 Minuten der Methylierungsanalyse eines Hydroxyprolin gebundenen Glykans der Sequenz HypAra<sub>2</sub>Gal aus Aminex-Fraktion D.

Sowohl die gaschromatographische Retentionszeit, als auch das Fragmentierungsmuster der erzeugten Derivate stimmen mit den Ergebnissen der bei der Analyse der *Arabidopsis*-Glykane beschriebenen 1,2 verbundenen Arabinosen überein (Seite 24). Somit trägt das HypGlykan HypAra<sub>2</sub>Gal die gleichen an Hydroxyprolin gebundenen Arabinoseeinheiten wie die entsprechenden Verbindungen HypAra<sub>3</sub> und HypAra<sub>4</sub> der Extensine höherer Pflanzen.

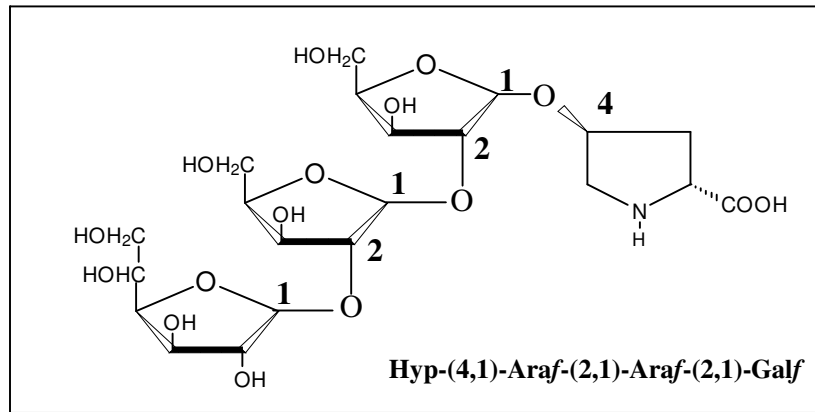
Das zweite gaschromatographische Signal der GC-MS-Analyse von HypAra<sub>2</sub>Gal, bei einer Retentionszeit von 24,77 Minuten, erklärt die terminale Galaktoseeinheit dieses Hydroxyprolin gebundenen Glykans (Abbildung 41).



**Abb.41:** EI-Fragmentierung zum Zeitpunkt von 24,77 Minuten der Analyse von HypAra<sub>2</sub>Gal aus Aminex-Fraktion D.

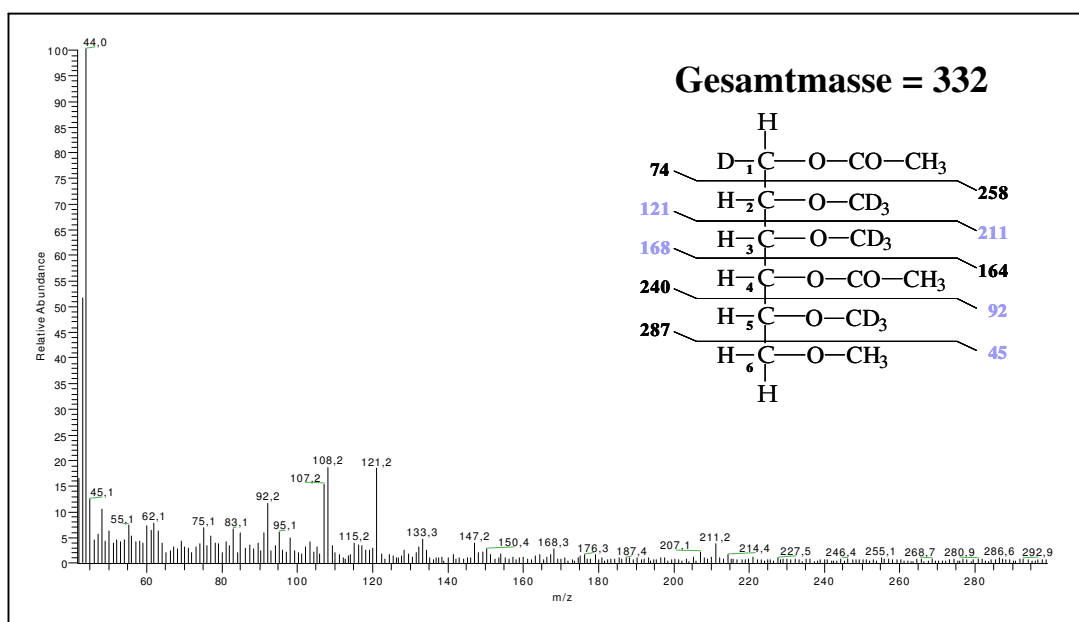
Die Fragment-Ionen bei m/z 121 und m/z 214 entstehen bei einem Bindungsbruch unterhalb von C<sub>3</sub> und beschreiben zunächst mit einer Gesamtmasse von 335 u das Derivat einer terminalen Galaktoseeinheit. Die Verknüpfungsposition ergibt sich aus den Fragment-Ionen bei m/z 74 und m/z 261 an Position C<sub>1</sub> des Zuckerrückrades. Signifikant ist das Auftreten eines Fragmentes bei m/z 95. Diese Ionenspur wird durch die deuteromethylierten Positionen C<sub>5</sub> und C<sub>6</sub> erklärt, die somit in der nativen Konformation der Verbindung freie OH-Gruppen tragen. Aus dem Fragmention bei m/z 167 ergibt sich die Position des Ringschlusses der Galaktoseeinheit an Position C<sub>4</sub> des Zuckerrückgrades. Es handelt sich daher bei diesem Monomer um eine terminale an Position C<sub>1</sub> verknüpfte Galaktofuranose.

Insgesamt kann daher für das HypGlykan der Masse von 557 u nach GC und Methylierungsanalyse folgende Struktur vorgeschlagen werden (Abbildung 42).



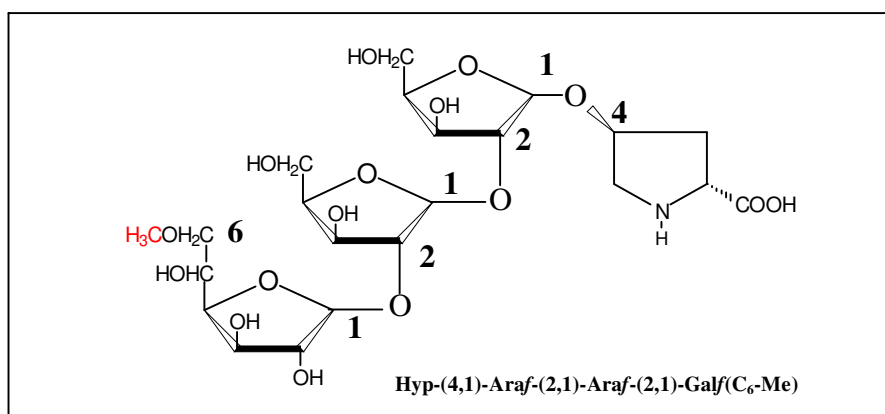
**Abb.42:** Struktur des Hydroxyprolin gebundenen Glykans HypAra<sub>2</sub>Gal (aus Aminex-Fraktion D).

Bei der nächst größeren, isolierten Verbindung, handelt es sich um das Hydroxyprolin gebundene Glykan einer Masse von 571 u. Aus der ESI-MS-Analyse lässt sich vermuten, dass diese Verbindung aus dem zuvor beschriebenen Glykan der Sequenzfolge HypAra<sub>2</sub>Gal durch Methylierung der terminalen Galaktosefuranoseeinheit hervorgeht. Das Gaschromatogramm der Methylierungsanalyse zeigt daher auch bei diesem HypGlykan zwei Signale mit dem erwarteten Signal-Flächenverhältnis von 2:1 und auch hier zeigt die EI-Fragmentierung des größeren Signals die beschriebenen Ionenspuren der 1,2 verbundenen Arabinoseeinheiten. Das zweite gaschromatographische Signal zum Zeitpunkt von 24,8 Minuten beschreibt die terminale Galaktoseeinheit der Verbindung. Betrachtet man hierzu das EI-Spektrum dieser Monomereinheit, so zeigen sich die aufgrund der nativen Methylgruppe erwarteten Unterschiede (Abbildung 43).



**Abb.43:** EI-Spektrum zum Zeitpunkt von 24,8 Minuten der Analyse des Glykans einer Masse von 571 u aus Aminex-Fraktion D.

Im Gegensatz zur Analyse der nativ nicht methylierten terminalen Galaktofuranose des Glykans HypAra<sub>2</sub>Gal einer Masse von 557 u bleiben Signale bei  $m/z$  48 und  $m/z$  214 aus. Stattdessen lassen sich Ionenspuren bei  $m/z$  45 und  $m/z$  211 beobachten, wodurch sich die native Methylgruppe der Monomereinheit über den Massenunterschied von 3 u deutlich von einer Deuteromethylgruppe der Derivatisierung unterscheiden lässt. Die Positionierung der Methylgruppe lässt sich außerdem durch das Fragmentation bei  $m/z$  45 u an Kohlenstoffposition C<sub>6</sub> des Zuckerrückgrades lokalisieren. Bei der Analyse dieser Verbindung lässt sich außerdem ein Fragmentation bei  $m/z$  92 beobachten, wodurch erklärt wird, dass es sich bei der terminalen Galaktoseeinheit auch dieser isolierten Verbindung, um eine Galaktofuranose handelt. Das Hydroxyprolin gebundene Glykan einer Masse von 571 u lässt sich daher nach ESI-MS, GC und Methylierungsanalyse, wie in Abbildung 44 aufgeführt, darstellen.



**Abb. 44:** Struktur des Hydroxyprolin gebundenen Glykans einer Masse von 571 u aus Aminex-Fraktion D. Rot markiert ist die native Methylgruppe der Verbindung an Position C<sub>6</sub> der terminalen Galaktofuranoseeinheit.

Bei der größten der präparativ angereicherten HypGlykane, handelt es sich um die Verbindung einer Masse von 703 u. Dieses Glykan ergibt sich aus der Kettenverlängerung des zu Beginn dieses Kapitels vorgestellten kürzeren Glykans HypAra<sub>2</sub>Gal um eine methylierte Arabinoseeinheit.

Das Gaschromatogramm der Methylierungsanalyse zeigt hierzu die drei Signale mit den Retentionszeiten von 22,15 Minuten, 23,28 Minuten und 27,24 Minuten. Davon zeigt das EI-Spektrum zum Zeitpunkt von 23,28 Minuten auch bei diesem Glykan die bereits beschriebenen Ionenspuren des Derivates 1,2 verknüpfter Arabinose. Somit enthält auch dieses aus *Chlamydomonas* gereinigte Glykan einer Masse von 703 u die für höhere Pflanzen charakteristischen an Hydroxyprolin direkt gebundenen Arabinosemonomere. Die EI-Fragmentierung zum Zeitpunkt von 27,24 Minuten ist nachstehend abgebildet und zeigt die Ionenspuren der kettenständigen Hexoseeinheit dieser Verbindung (Abbildung 45).



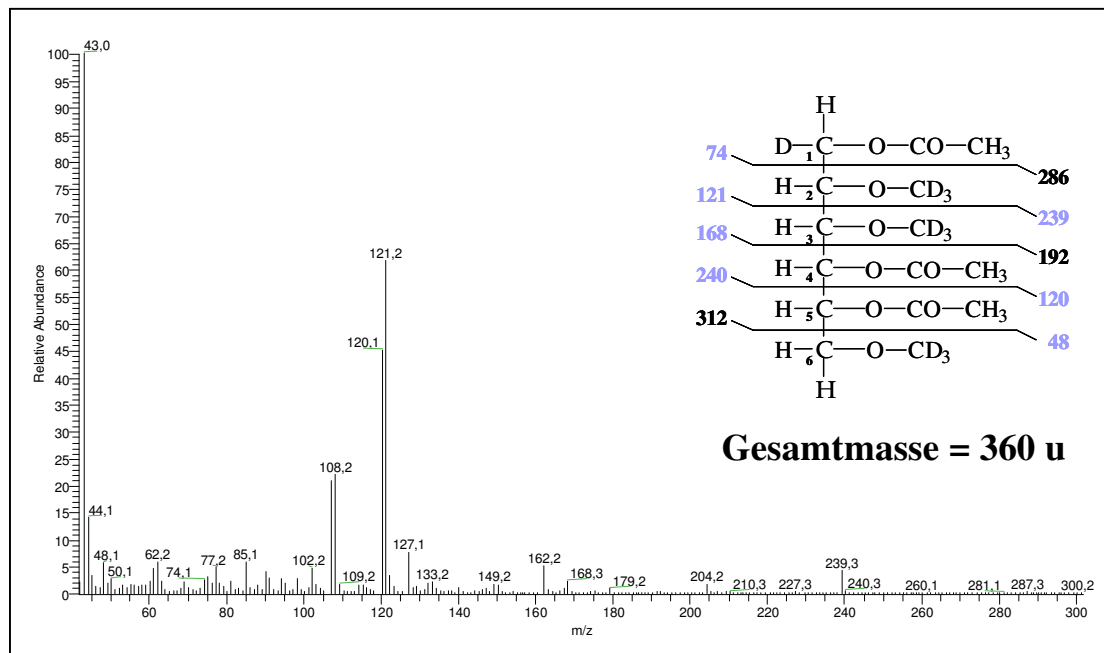
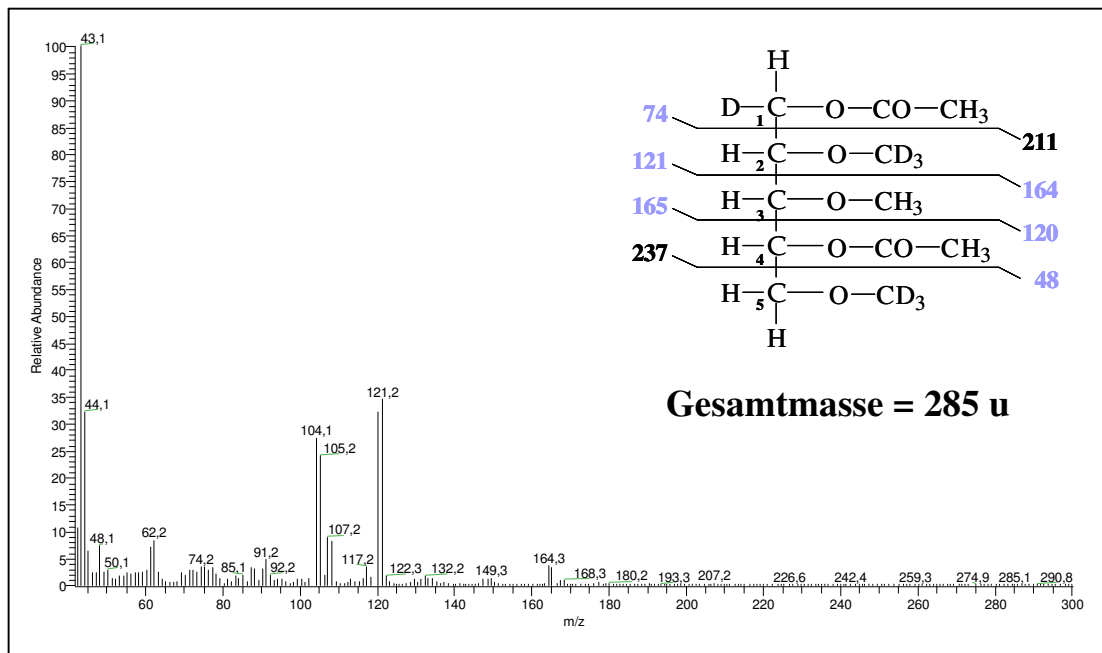


Abb. 45: EI-Fragmentierung bei 27,24 Minuten der Methylierungsanalyse eines Hydroxyprolin gebundenen Glykans der Masse 703 u aus Aminex-Fraktion C.

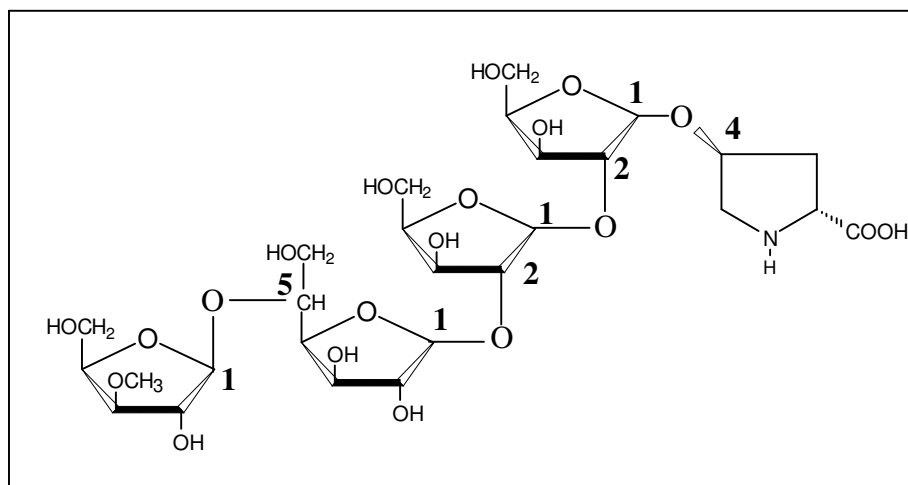
Hierbei beschreiben die Hauptfragmentationen bei m/z 74 und 121 die Lage einer Acetylgruppe an Kohlenstoffposition C<sub>1</sub>. Darüber hinaus treten aber weitere Hauptfragment-Ionen bei m/z 48, 168 und 239 auf, die die Lage zweier weiterer Acetylgruppen an den Kohlenstoffpositionen C<sub>4</sub> und C<sub>5</sub> anzeigen. Dabei ist an dieser Stelle nicht eindeutig festzulegen, ob es sich bei der vorliegenden Monomerstruktur um das Derivat einer 1,5 verknüpften Galaktofuranose oder einer 1,4 verknüpften Galaktopyranose handelt, da beide Monomereinheiten in diesem Fall gleich derivatisiert werden.

Bei der terminalen Monomereinheit des HypGlykans einer Masse von 703 u handelt es sich nach den Ergebnissen der GC- und der ESI-MS-Untersuchungen um eine nativ methylierte Arabinoseeinheit. Die entsprechende EI-Fragmentierung einer terminalen Arabinoseeinheit wurde bei der Analyse der Arabidopsis Glykane in Kapitel 2.1.4 bereits erläutert. Dabei treten bei der Fragmentierung der nativ methylierten Arabinoseeinheit des HypGlykans einer Masse von 703 u aus *Chlamydomonas* aber signifikante Fragmentationen bei m/z 164 und m/z 165 auf, die erklären, dass es sich um eine nativ C<sub>3</sub>-Methylierte Arabinoseeinheit handelt (Abbildung 46).



**Abb.46:** EI-Fragmentierung bei 22,15 Minuten des Hydroxyprolin gebundenen Glykans einer Masse von 703 u aus Aminex-Fraktion C.

Insgesamt setzt sich das HypGlykan der Masse 703 u aus zwei an Hydroxyprolin gebundenen 1,2 verknüpften Arabinoseeinheiten, einer daran gebundenen Galaktoseeinheit und einer terminalen C<sub>3</sub>-methylierten Arabinoseeinheit zusammen (Abbildung 47). Im Falle der Galaktose muss die Frage offen bleiben in welcher Ringkonfiguration das Monomer vorliegt da, nach entsprechender Aufarbeitung, nicht zwischen den Derivaten einer 1,4 verbundenen Galaktopyranose und einer 1,5 verbundenen Galaktofuranose unterschieden werden kann.

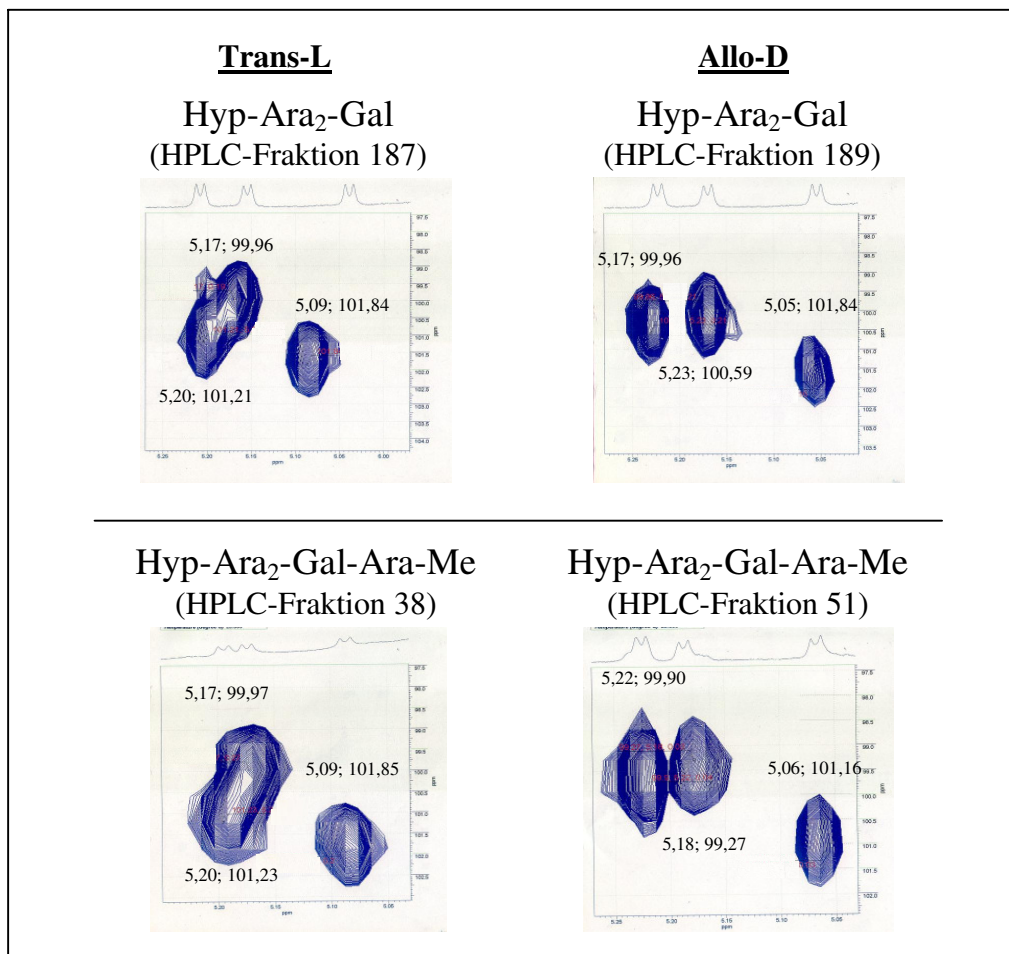


**Abb.47:** Struktur eines HypGlykans einer Masse von 703 u aus Aminex-Fraktion C. Bei der Galaktoseeinheit kann aufgrund der identischen Derivatisierung bei der GC-MS-Analyse die genaue Ringkonfiguration nicht ermittelt werden, eine 1,4 verbundene Galaktopyranose wäre bei dieser Verbindung ebenso denkbar.

## 2.2.5 NMR-Analyse präparativ gereinigter HypGlykane aus *Chlamydomonas reinhardtii*

Bislang konnten durch gaschromatographische und massenspektrometrische Analysen sowie durch die Methylierungsanalyse Information über die Art der Monomerbestandteile, ihrer Sequenzfolge und ihrer Verknüpfung untereinander gewonnen werden. Darüber hinaus wurden ebenso wie in Kapitel 2.1 für die HypGlykane aus *Arabidopsis*, zur Bestimmung der anomeren Konformationen der Monomereinheiten NMR-Messungen durchgeführt.

Abbildung 48 zeigt hierzu zunächst die zweidimensionalen H-C-Cosy-Spektren im Bereich der glykosidischen Bindungen der vier in ihrer Trans- und Cis-Hydroxyprolin gebundenen Form erhaltenen Glykane HypAra<sub>2</sub>Gal und HypAra<sub>2</sub>GalAra(Me).



**Abb. 48:** H-C-Cosy-Spektren im Bereich der glykosidischen Bindungen der jeweils Trans- und Cis-Hydroxyprolin gebundenen Glykane der Massen 557 u und 703 u. Die angegebenen Werte beschreiben die chemischen Verschiebungen  $\delta$  durch <sup>1</sup>H-Atome (erster Wert; X-Achse) und <sup>13</sup>C-Atome (zweiter Wert; Y-Achse).

Auffallend ist hierbei zunächst, dass die zwei größeren Glykane HypAra<sub>2</sub>GalAra(Me) ebenso wie die beiden um eine Monomereinheit kürzeren Verbindungen jeweils nur drei Signale in den Kopplungsbereichen der glykosidischen Bindung aufweisen. Ein erwartetes viertes Signal war bei diesen Messungen zunächst nicht zu beobachten. Weitere <sup>1</sup>H-NMR-Analysen, die bei einer höheren Temperatur von 50 °C durchgeführt wurden, zeigen dieses vierte Signal, dass bei tieferer Temperatur vom Lösemittelsignal überlagert wurde. Die entsprechenden <sup>1</sup>H-Resonanzen sind hierzu dem Anhang auf den Seiten 172 und 173 beigelegt.

Bemerkenswert bei der Betrachtung der vier NMR-Bereiche ist außerdem die bei der *Arabidopsis* Analyse bereits beschriebene charakteristische Anordnung der Arabinose-Signale im Bereich der glykosidischen Bindungen (Seite 30). Die ermittelten chemischen Verschiebungen der 1,2 verbundenen Arabinoseeinheiten beider Organismen sind nahezu gleich.

Daneben zeigt die NMR-Analyse der HypGlykane aus *Chlamydomonas* die zuvor für *Arabidopsis* beschriebene auffällige Anordnung von Signalen in Folge einer Stellungsisomerie an Hydroxyprolin. Auch hier zeigen die Untersuchungen der H-C-Korrelationen der Hydroxyprolinreste der isobaren Verbindungen den für eine Cis-Trans-Isomerie beschriebenen Unterschied der Signale der beiden Protonen an Kohlenstoffposition C<sub>3</sub> (Tabelle 5).

**Tabelle 5:** <sup>13</sup>C- und <sup>1</sup>H-Verschiebungen der Hydroxyprolinreste von Hyp-Ara<sub>2</sub>-Gal und Hyp-Ara<sub>2</sub>-Gal-Ara(Me) aus den Aminex-Fractionen C und D. Die chemischen Verschiebungen tragen den Zusatz ppm.

HypGlykan	H2	H3	H4	H5	C2	C3	C4	C5
<b>Trans</b> -Hyp-Ara <sub>2</sub> -Gal (HPLC-Fraktion 187)	4,11	2,37 2,51	4,12	3,30 3,50	61,1	37,1	78,0	52,9
<b>allo</b> -Hyp-Ara <sub>2</sub> -Gal (HPLC-Fraktion 189)	4,21	2,60 2,10	4,13	3,40	61,7	37,8	78,0	52,3
<b>Trans</b> -Hyp-Ara <sub>2</sub> -Gal-Ara(Me) (HPLC-Fraktion 38)	4,15	2,39 2,51	4,11	3,34 3,52	61,1	37,2	78,0	52,9
<b>allo</b> -Hyp-Ara <sub>2</sub> -Gal-Ara(Me) (HPLC-Fraktion 51)	4,27	2,60 2,10	4,12	3,45	61,9	37,8	78,0	52,3

Die anomeren Konformationen der Monomerbestandteile der vier dargestellten Verbindungen ergeben sich aus den chemischen Verschiebungen der anomeren Atome im Bereich der glykosidischen Bindungen. Tabelle 6 fasst hierzu die über <sup>13</sup>C und <sup>1</sup>H-NMR Studien gewonnenen Ergebnisse zusammen.

**Tabelle 6:**  $^{13}\text{C}$ - und  $^1\text{H}$ -Verschiebungen der Hydroxyprolinreste von HypAra<sub>2</sub>Gal und HypAra<sub>2</sub>GalAra(Me) aus den Aminex-Fractionen C und D.

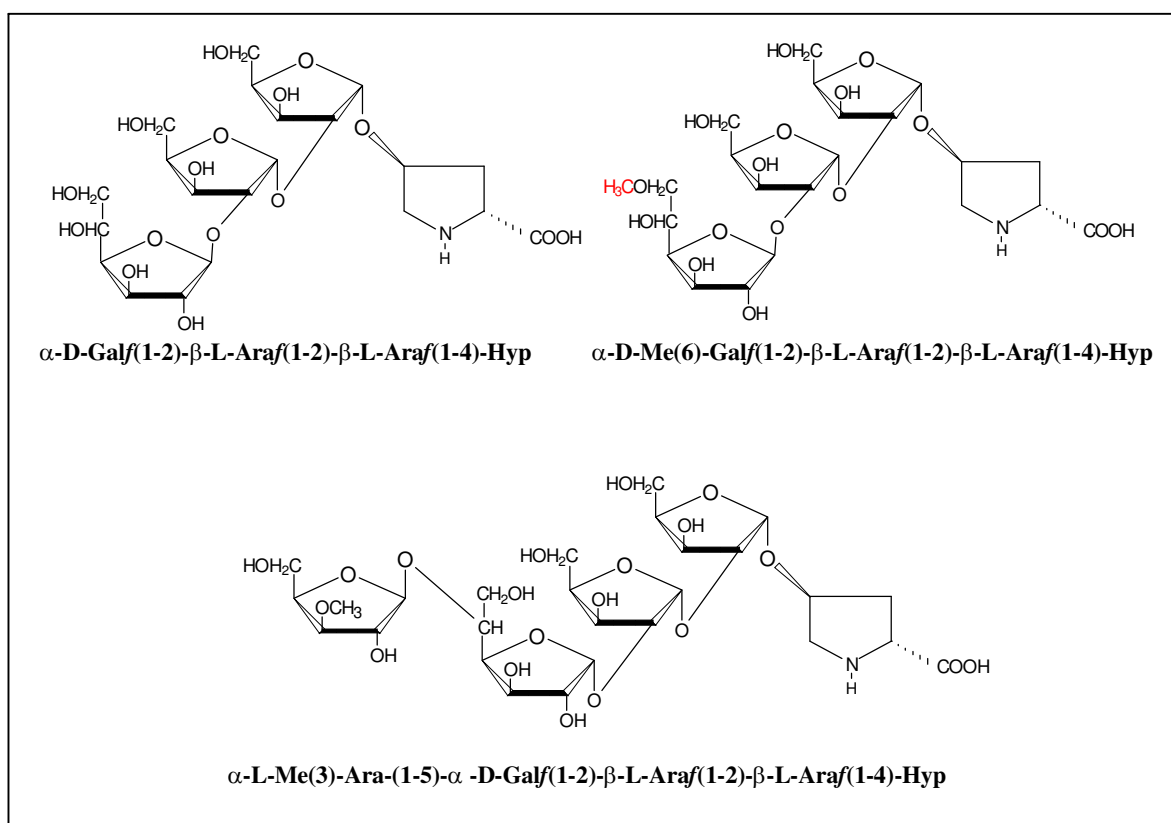
HypGlykan	Monomereinheit	C <sub>1</sub> [ppm]	H <sub>1</sub> [ppm]	J <sub>1,2</sub> [Hz]
Trans-Hyp-Ara <sub>2</sub> -Gal	A	99,96	5,17	4,1
	B	101,21	5,20	4,5
	C	101,84	5,09	4,5
allo-Hyp-Ara <sub>2</sub> -Gal	A	99,96	5,17	4,4
	B	100,59	5,23	4,4
	C	101,84	5,05	4,4
Trans-Hyp-Ara <sub>2</sub> -Gal-Ara(Me)	A	99,97	5,17	4,3
	B	101,23	5,20	4,5
	C	101,85	5,09	4,5
	D	---	5,06	3,5
allo-Hyp-Ara <sub>2</sub> -Gal-Ara(Me)	A	99,97	5,18	4,3
	B	99,90	5,22	4,5
	C	101,16	5,06	4,5
	D	---	5,08	3,7

Bei allen untersuchten Verbindungen zeigen die ersten beiden an Hydroxyprolin gebundenen Arabinosen (Monomere A und B) bezüglich ihrer anomeren C-Atome eine chemische Verschiebung im Bereich von 100 ppm. Die Signale der korrespondierenden Protonen zeigen Duplets mit einer chemischen Verschiebung im Bereich von 5,2 ppm und Kopplungskonstanten zwischen 4 und 4,5 Hz. Damit liegen die beiden an Hydroxyprolin gebundenen Arabinoseeinheiten aller vier Glykane im Bereich der  $\beta$ -L-Konformation [59] und tragen somit die gleiche Konformation im Vergleich zu den aus *Arabidopsis thaliana* isolierten Glykanen HypAra<sub>3</sub> und HypAra<sub>4</sub>. Bei der dritten Monomereinheit der aus *Chlamydomonas* isolierten Verbindungen (Monomer C) handelt es sich um die durch GC und Methylierungsanalyse charakterisierte Galaktose. Diese Galaktoseeinheiten sind, mit  $^{13}\text{C}$ -Verschiebungen im Bereich von 101 ppm und  $^1\text{H}$ -Resonanzen im Bereich von 5 ppm (Kopplungskonstanten um 4,5 Hz), im Falle der beiden kleineren Verbindungen  $\alpha$ -D konfiguriert. Bei den beiden größeren Glykanen HypAra<sub>2</sub>GalAraMe konnte für die Galaktosemonomere bei der Methylierungsanalyse zuvor keine eindeutige Aussage über die Konformation des anomeren Zentrums getroffen werden (Kapitel 2.2.4). Die NMR-Analyse zeigt aber auch bei diesen Hexoseeinheiten mit  $^{13}\text{C}$ -Verschiebungen im Bereich von 101 ppm und  $^1\text{H}$ -Resonanzen von 5 ppm die Konformation einer  $\alpha$  verbundenen Hexofuranose. Diese größeren Glykane werden zudem von einer terminalen, methylierten Arabinoseeinheit abgeschlossen (Monomer D). Die bei höherer Temperatur durchgeführten  $^1\text{H}$ -Spektren zeigen in beiden Fällen chemische Verschiebungen der anomeren Protonen im Bereich von 5 ppm mit Kopplungskonstanten um 3,5 Hz. Die endständigen Arabinoseeinheiten der HypGlykane einer Masse von 703 u liegen daher  $\alpha$ -L konfiguriert vor.

### 2.2.6 Zusammenfassung der Analyse präparativ gereinigter HypGlykane aus *Chlamydomonas reinhardtii*

Bei der präparativen Aufarbeitung Hydroxyprolin gebundener Glykane aus *Chlamydomonas reinhardtii* konnten insgesamt fünf HypGlykane in Reinfraction gewonnen werden. Dabei handelt es sich um die Cis- und Trans-Hydroxyprolin gebundenen Glykane einer Masse von 557 u und 703 u und einer weiteren Struktur einer Masse von 571 u. Die fünf Verbindungen wurden zunächst durch ESI-MS<sup>n</sup>-Experimente sequentiell beschrieben und über gaschromatographische Analysen auf ihre Monomerbestandteile hin untersucht. Dabei zeigt sich, dass alle der untersuchten Glykane aus *Chlamydomonas* ebenso wie die aus *Arabidopsis* isolierten Glykane zwei an Hydroxyprolin gebundene Arabinoseeinheiten besitzen. Außerdem tragen die kürzerkettigen HypGlykane aus *Chlamydomonas* einen weiteren Monomerbestandteil, die Galaktose. Über Methylierungsanalysen konnte gezeigt werden, dass Galaktoseeinheiten der untersuchten Glykanstrukturen in der für Pflanzen außergewöhnlichen Furanoseform vorliegen. Die Methylierungsanalysen ergeben zudem die genauen Verknüpfungspositionen der Monomerbausteine untereinander. Die ersten beiden an Hydroxyprolin gebundenen Arabinoseeinheiten aller Verbindungen tragen dabei die für Extensine höherer Pflanzen beschriebenen Verknüpfungspositionen (1-2 Verknüpfung). Durch NMR-Studien konnte gezeigt werden, dass sich diese Arabinosemonomere auch in der für die Extensine beschriebenen  $\beta$ -L-Konformation befinden. Die Galaktosemonomere der Glykane HypAra<sub>2</sub>Gal sind  $\alpha$ -D konfiguriert. Die beiden größeren HypGlykane einer Masse von 703 u tragen ebenfalls eine 1,5 verbundene Galaktofuranoseeinheit an ihrer dritten Kettenposition. Diese größeren Verbindungen werden darüber hinaus terminal von einer  $\alpha$ -L konfigurierten Arabinoseeinheit abgeschlossen, wobei auch die Konformation dieser Arabinosen der für die terminale Arabinoseeinheit von HypAra<sub>4</sub> aus Extensinen höherer Pflanzen ermittelten Anordnung entspricht.

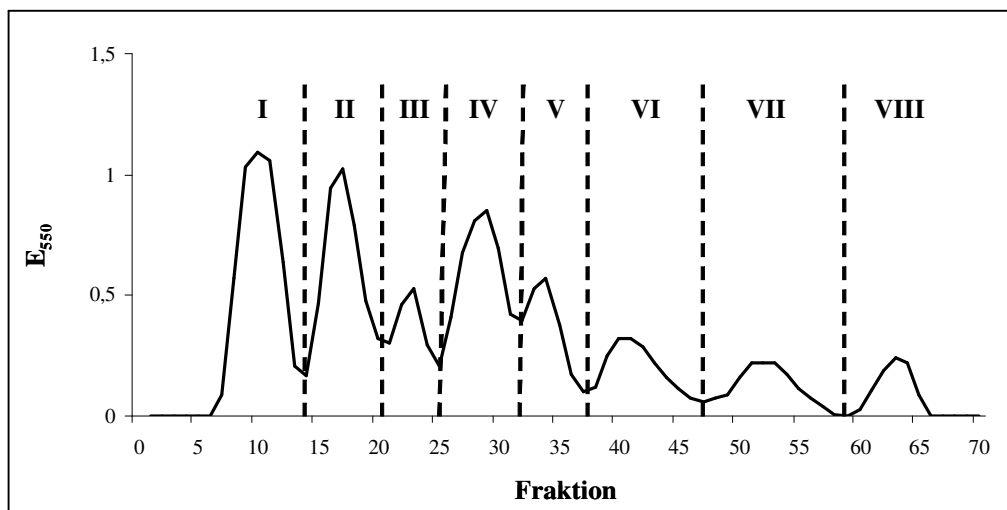
Abschließend zu diesem Kapitel werden die drei Strukturen der Hydroxyprolin gebundenen Glykane der Massen 557 u, 571 u und 703 u graphisch dargestellt. Bei den beiden in ihrer Cis- und Trans-Hydroxyprolin gebundenen Form untersuchten Verbindungen werden jeweils die Trans-isomeren Verbindungen dargestellt (Abbildung 49).



**Abb.49:** HypGlykane aus *Chlamydomonas reinhardtii*. Gezeigt sind die dominanten kürzerkettigen Glykane der Aminex-Fractionen C und D.

### 2.3 Analyse einer Gesamtpräparation Hydroxyprolin gebundener Glykane aus *Chlamydomonas reinhardtii*

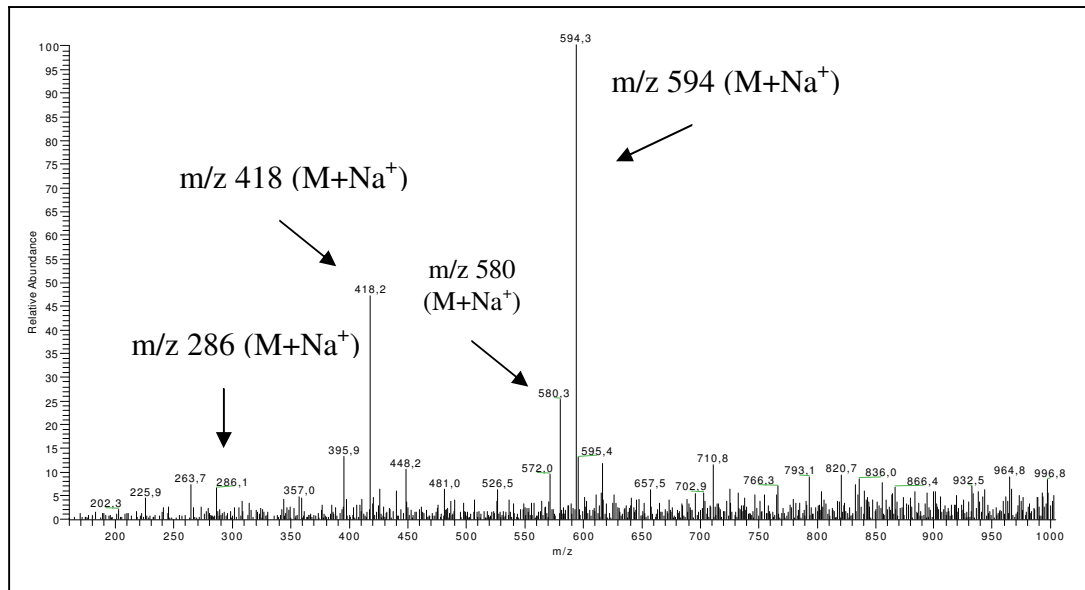
Die Vorarbeiten zur Strukturaufklärung der kürzeren linearen Hydroxyprolin gebundenen Glykane aus *Chlamydomonas reinhardtii* haben gezeigt, dass die magnetische Kernresonanzspektroskopie wertvolle strukturelle Erkenntnisse bezüglich der Konformation der Zuckermomere liefert. Andererseits ist aber auch eine hohe Substanzmenge für die NMR-Analysen erforderlich, so dass es unmöglich ist alle *Chlamydomonas* Glykane hierfür in ausreichender Menge zu isolieren. Zur Beschreibung aller HypGlykane einer *Chlamydomonas*-Zellwandpräparation wurde daher eine neue Strategie angewendet. Durch die Kombination von ESI-MS, GC und Methylierungsanalyse wurden die Hydroxyprolin gebundenen Glykane aus *Chlamydomonas* bezüglich ihrer Zuckermomere und der Verknüpfung dieser Monomerbausteine untereinander untersucht. Auf eine Trennung der Cis- und Trans-Hydroxyprolin gebundenen Isomere über eine HPLC-Aminopropylphase wurde dabei verzichtet. Zur Analyse wurde der Rohextrakt einer Algenpräparation zunächst, wie in den Kapiteln zuvor beschrieben, über Kationenaustauschchromatographie vorfraktioniert und die gebildeten Fraktionen über Größenausschlußchromatographie entsalzt. Um die Trennung der verschiedenen HypGlykane zu optimieren, wurde die Laufzeit der Kationenaustauschchromatographie von 20 auf 48 Stunden heraufgesetzt. Die Trennung durch den, im Vergleich zu den vorherigen Analysen flacheren, Gradienten erlaubte die Bildung von acht Aminex-Fractionen (Abbildung 50).



**Abb.50:** Aminex-Kationenaustauschchromatographie einer *Chlamydomonas reinhardtii* Zellwandpräparation. Die Bestimmung der Signalfractionen erfolgte nach Kivirikko [52] photometrisch bei einer Wellenlänge von 550 nm. Gezeigt ist der gleitende Durchschnitt der Einzelmessungen.



Abbildung 51 zeigt zunächst die massenspektrometrische Analyse von Aminexfraktion 8, der Fraktion mit den kleinsten Hydroxyprolin gebundenen Glykanen der Aufarbeitung.



**Abb. 51:** ESI-MS Spektrum Hydroxyprolin gebundener Glykane aus Aminexfraktion 8.

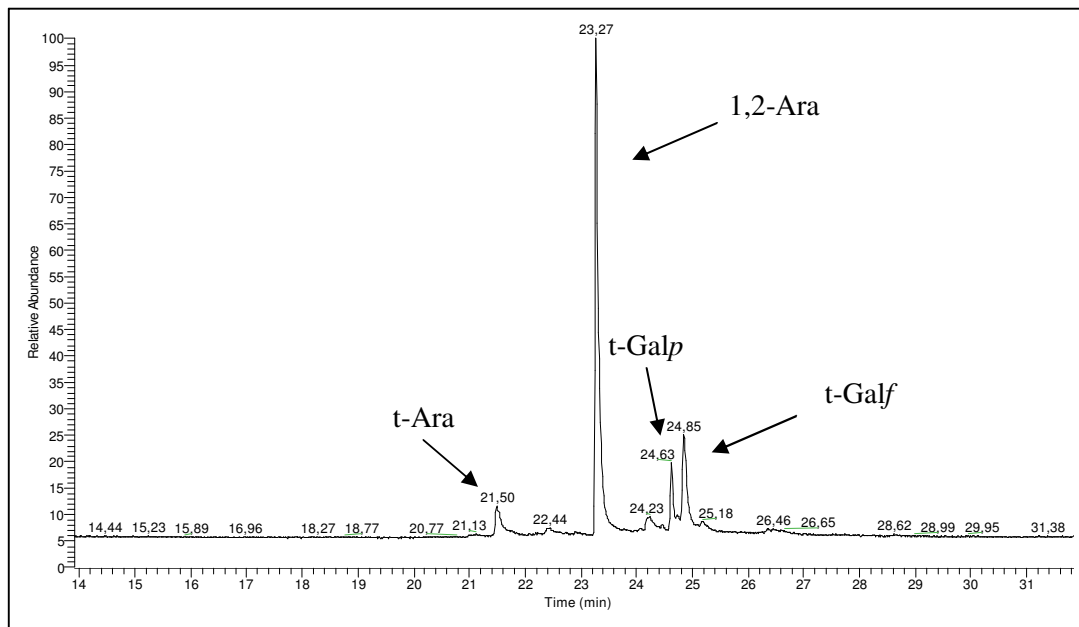
Zu sehen sind die Quasimolekularionen von vier Glykanen bei  $m/z$  286, 418, 580 und 594 in Form ihrer Natriumaddukte (s. Markierung), sowie die jeweils um 22 Masseneinheiten kleineren Wasserstoffaddukte der gleichen Verbindungen. Die Ermittlung der Sequenz dieser vier Glykane erfolgte über ESI-MS-Stoßfragmentierungen. Dabei lassen sich bei allen vier Glykanen die in Kapitel 2.2 dargestellten charakteristischen Ionenspuren linearer Glykane ermitteln. Die bei der Stoßfragmentierung dieser Verbindungen entstehenden Y-Fragmentionen sind in Tabelle 7 zusammengefasst, die dazugehörigen Stoßfragmentierungen sind dem Anhang ab Seite 148 zu entnehmen.

**Tabelle 7:** ESI-MS-Analyse von Aminex-Fraktion 8.

HypGlykan-Masse	Molekularion	Y-Fragmentionen [M+Na <sup>+</sup> ]	Sequenz
263 u	m/z 286 [M+Na <sup>+</sup> ] m/z 264 [M+H <sup>+</sup> ]	286 → 154 Y <sub>1</sub> Y <sub>0</sub>	Hyp-Ara
395 u	m/z 418 [M+Na <sup>+</sup> ] m/z 396 [M+H <sup>+</sup> ]	418 → 286 → 154 Y <sub>2</sub> Y <sub>1</sub> Y <sub>0</sub>	Hyp-Ara <sub>2</sub>
557 u	m/z 580 [M+Na <sup>+</sup> ] m/z 558 [M+H <sup>+</sup> ]	580 → 418 → 286 → 154 Y <sub>3</sub> Y <sub>2</sub> Y <sub>1</sub> Y <sub>0</sub>	Hyp-Ara <sub>2</sub> -Gal
571 u	m/z 594 [M+Na <sup>+</sup> ] m/z 572 [M+H <sup>+</sup> ]	594 → 418 → 286 → 154 Y <sub>3</sub> Y <sub>2</sub> Y <sub>1</sub> Y <sub>0</sub>	Hyp-Ara <sub>2</sub> -GalMe

Darüber hinaus zeigt die gaschromatographische Analyse der Zuckermomere dieser Aminexfraktion nach entsprechender Aufarbeitung, dass sich die vier Hydroxyprolin gebundenen Glykane ausschließlich aus den Monomerbestandteilen Arabinose und Galaktose zusammensetzen (siehe Kapitel 2.2.3). Bei den kleinsten Verbindungen der Massen 263 und 395 u handelt es sich um zwei Glykane, die sich demnach aus einer kettenständigen und einer terminalen Arabinoseeinheit zusammensetzen. Bei den beiden größeren Zuckern einer Masse von 557 bzw. 571 u schließt eine Galaktoseeinheit, im Falle des Glykans der Masse 571 u eine nativ methylierte Galaktoseeinheit das HypGlykan jeweils terminal ab.

Die Methylierungsanalyse der Monomereinheiten aus Aminex-Fraktion 8 zeigt gaschromatographisch insgesamt vier Signale (Abbildung 52).

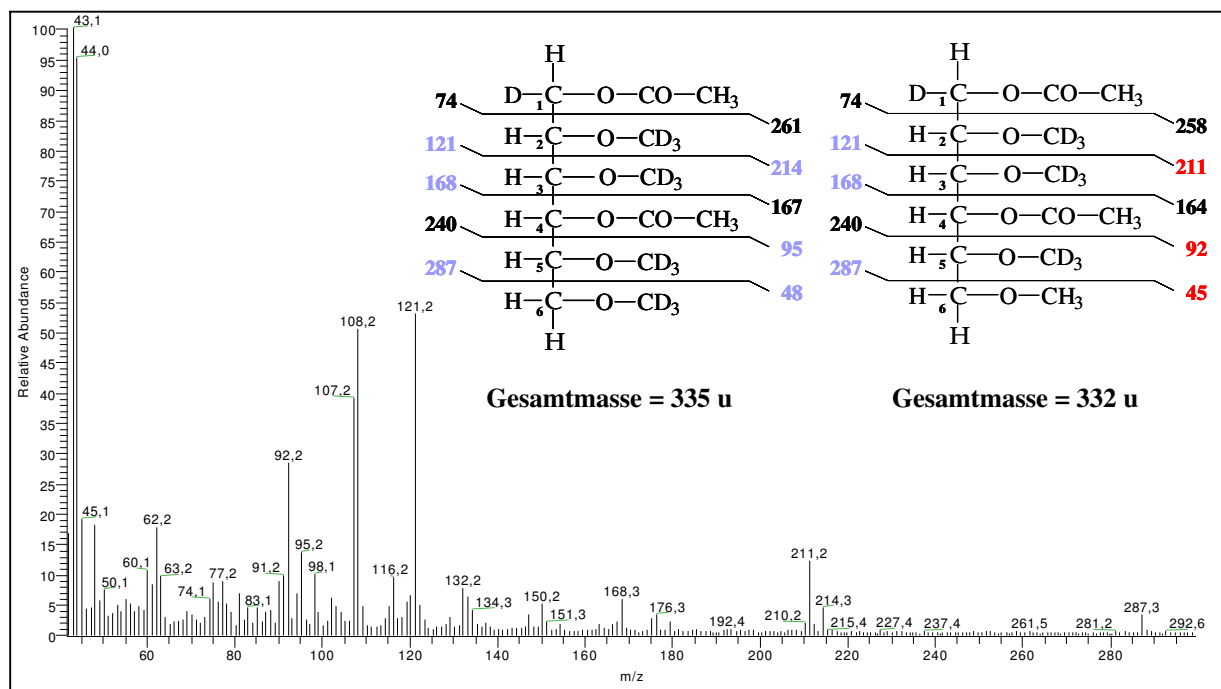


**Abb.52:** Gaschromatogramm zur Methylierungsanalyse von Aminex-Fraktion 8.

Das größte dieser Signale bei einer Retentionszeit von 23,27 Minuten entspricht nach seiner EI-Fragmentierung der in Kapitel 2.1.4 bereits beschriebenen 1,2 verknüpften Arabinoseeinheit. Darüber hinaus zeigen die Methylierungsanalysen auch aller noch nachfolgend untersuchten Aminex-Fractionen keinen weiteren einfach verknüpften Pentosebestandteil. Somit kann, neben der Analyse der Reinfractionen auch grundsätzlich gezeigt werden, dass die zwei direkt an Hydroxyprolin gebundenen Arabinoseeinheiten aller aus *Chlamydomonas* untersuchten Glykane die für höhere Pflanzen beschriebenen charakteristischen Verknüpfungspositionen tragen.

Bei dem zweiten gaschromatographischen Signal zum Zeitpunkt von 21,50 Minuten handelt es sich um das Signal der terminal, nur an Position 1 verbundenen Arabinoseeinheit der beiden kleinsten HypGlykane HypAra und HypAra<sub>2</sub> (EI-Fragmentierung im Anhang auf Seite 159).

Als interessant erweist sich die Betrachtung der Fragmentierungsspektren der zwei zu späteren Zeitpunkten auftretenden Signale. Es handelt sich dabei um die terminalen Galaktoseeinheiten der Glykane HypAra<sub>2</sub>Gal und HypAra<sub>2</sub>GalMe. Beide HypGlykane wurden bereits in ihrer Reinform analysiert und dargestellt (Kapitel 2.1.6). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Galaktose in den gereinigten Glykanen in der für Hexosen besonderen Ringkonfiguration, als Hexofuranose vorliegt. Die EI-Fragmentierung der Methylierungsanalyse von Aminex-Fraktion 8, zeigt zum Zeitpunkt von 24,85 Minuten, die bereits bei der Analyse der Reinfractionen beschriebenen Ionenspuren. Sie zeigt aber auch gleichzeitig die gaschromatographische Koelution von nativ methylierter und nativ unmethylierter, terminaler Galaktofuranose (Abbildung 53).



**Abb.53:** EI-Fragmentierung bei 24,85 Minuten der Methylierungsanalyse von Aminex-Fraktion 8.

Der durch die Deuteromethylierung der freien OH-Gruppen im Vergleich zur nativen Methylierung bestehende Massenunterschied von 3 u kennzeichnet sich hierbei unter anderem in den Ionenspuren bei m/z 211 und m/z 214. Darüber hinaus ergibt sich die Positionierung der Methylgruppe des HypGlykans einer Masse von 571 u über die Ionenspur bei m/z 45 an Kohlenstoffposition C<sub>6</sub> der terminalen Hexoseeinheit. Somit kann die in Kapitel 2.2.4 für dieses Glykan ermittelte Methylgruppenposition bestätigt werden.

Bemerkenswert an der gaschromatographischen Koelution von methylierter und unmethylierter terminaler Galaktose ist, dass hier gleich zwei Monomerbestandteile der Fraktion in einem Signal auftreten und damit die drei bisher erläuterten GC-Signale scheinbar alle erwarteten Monomerbestandteile von Aminex-Fraktion 8 erklären. Daher stellt sich die Frage nach dem vierten gaschromatographischen Signal der Methylierungsanalyse dieser Fraktion bei einer Retentionszeit von 24,63 Minuten.

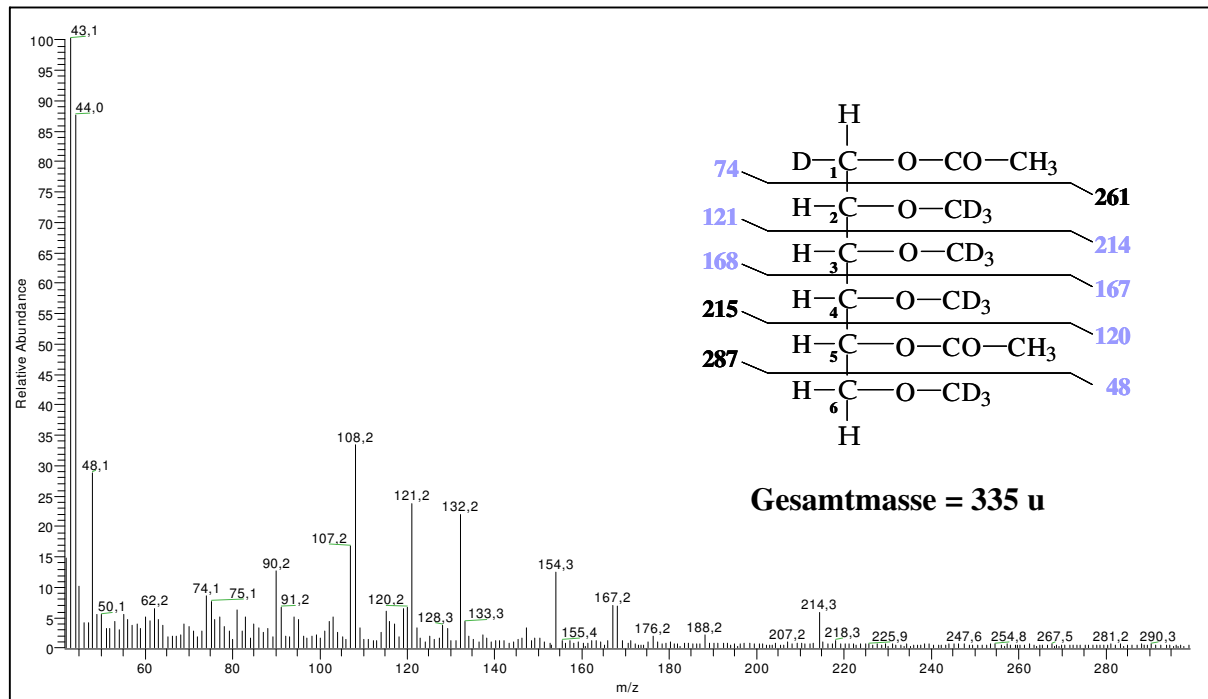


Abb.54: EI-Fragmentierung bei 24,63 Minuten der Methylierungsanalyse von Aminex-Fraktion 8.

Die Ionenspuren bei m/z 167 und m/z 168 beschreiben unter Berücksichtigung seiner Gesamtmasse von 335 u zunächst das Derivat einer weiteren terminalen Hexoseeinheit. Im Gegensatz zu der bereits beschriebenen Galaktofuranosefragmentierung, tritt jedoch kein für die Furanose typisches Signal bei m/z 95 auf. Stattdessen beschreiben die Ionenspuren bei m/z 48 und m/z 167 die Lage einer Acetylgruppe an Kohlenstoffposition C<sub>5</sub> und erklären somit die Ringposition der Verbindung. Es handelt sich bei der zum gaschromatographischen Zeitpunkt von 24,63 Minuten eluierenden Verbindung um das Derivat einer terminalen Galaktopyranose. Somit lässt sich beobachten, dass grundsätzlich terminale Hexoseeinheiten beider Ringkonfigurationen in *Chlamydomonas reinhardtii* vertreten sind.

Darüber hinaus ist bei der Betrachtung der Galaktopyranosefragmentierung auch auffällig, dass im Vergleich zu den Galaktofuranosesignalen keine für eine Methylgruppe charakteristische Ionenspur bei m/z 211 auftritt und auch kein Signal bei m/z 92 zu beobachten ist. Dieser

Befund, der hier exemplarisch für alle noch folgenden Analysen dargestellt ist, zeigt, dass von den terminalen Hexoseeinheiten bestimmter Hydroxyprolin gebundener Glykane nur die Hexofuranosen natürlich methyliert vorliegen und somit die terminale Galaktopyranose auch nicht dem methylierten HypGlykan einer Masse von 571 u aus Aminex-Fraktion 8 zuzuordnen ist. Die massenspektrometrische Analyse von Aminex-Fraktion 8 hat aber zuvor gezeigt, dass neben der Verbindung einer Masse von 571 u lediglich das Glykan einer Masse von 557 u über eine terminale Hexoseeinheit verfügt. So erklärt die Methylierungsanalyse gleichzeitig, dass dieses Glykan mit terminalen Galaktoseeinheiten beider Ringkonfigurationen abgeschlossen sein muss. Zusammengefasst lassen sich die Hydroxyprolin gebundenen Glykane aus Aminex-Fraktion 8 daher wie in Abbildung 55 graphisch aufgeführt darstellen.

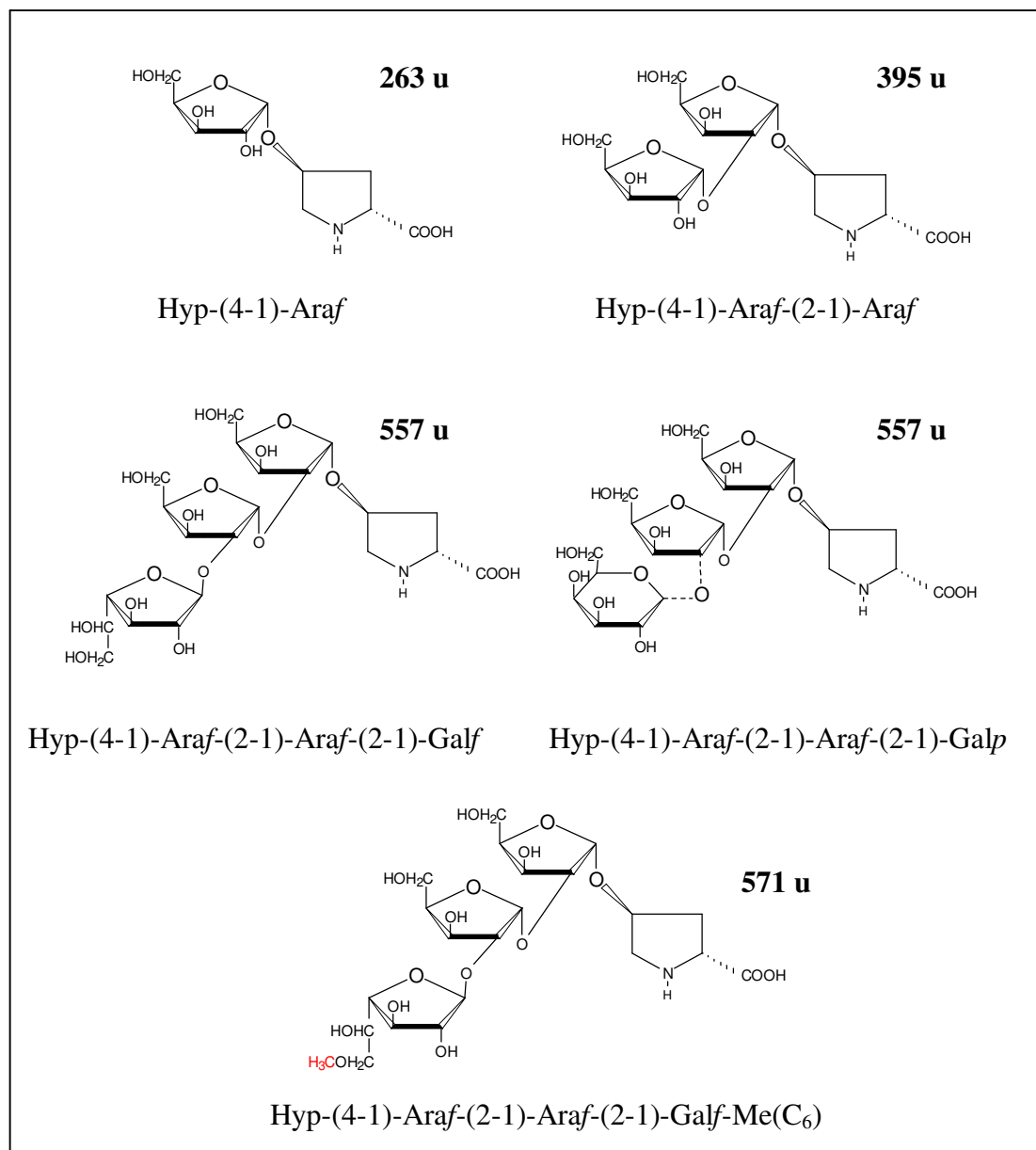


Abb. 55: Hydroxyprolin gebundene Glykane aus Aminex-Fraktion 8.

Die Analyse der Monomierzusammensetzung von Aminex-Fraktion 7 ist im Vergleich zur Analyse von Fraktion 8 weniger kompliziert. Das ESI-MS-Gesamtspektrum von Fraktion 7 zeigt die Anreicherung der bereits in Kapitel 2.2 beschriebenen Verbindung HypAra<sub>2</sub>Gal in Form seiner Wasserstoff- und Natriumaddukte bei m/z 558 und m/z 580 (Abbildung 56).

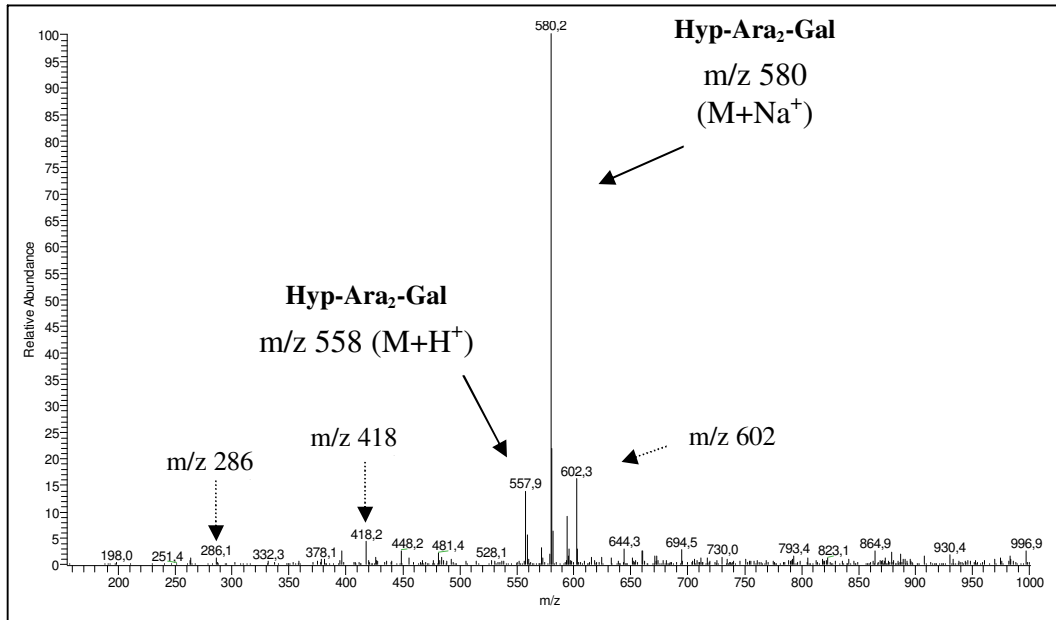


Abb.56: ESI-MS-Gesamtspektrum Hydroxyprolin gebundener Glykane aus Aminex-Fraktion 7.

Daneben zeigt das MS-Gesamtspektrum in geringen Anteilen die HypGlykane der Massen 263 und 395 u in Form ihrer Natriumaddukte, sowie eine unbekannte Verbindung bei m/z 602. Das Gaschromatogramm zur Methylierungsanalyse von Aminex-Fraktion 7 zeigt entsprechend der hohen Anreicherung des Glykans HypAra<sub>2</sub>Gal einer Masse von 557 u die bereits beschriebenen Derivate von 1,2 verknüpfter Arabinose und terminaler Galaktose (Abbildung 57).

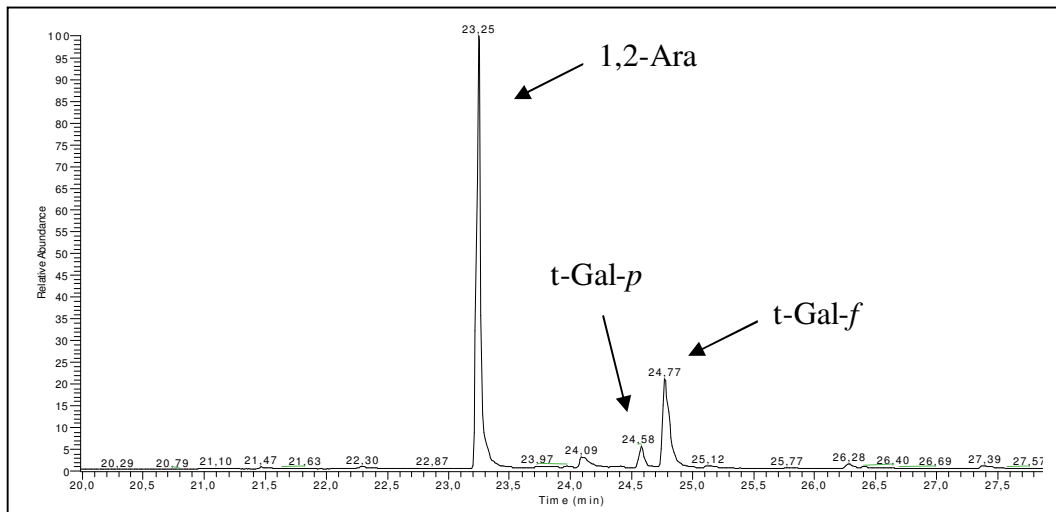
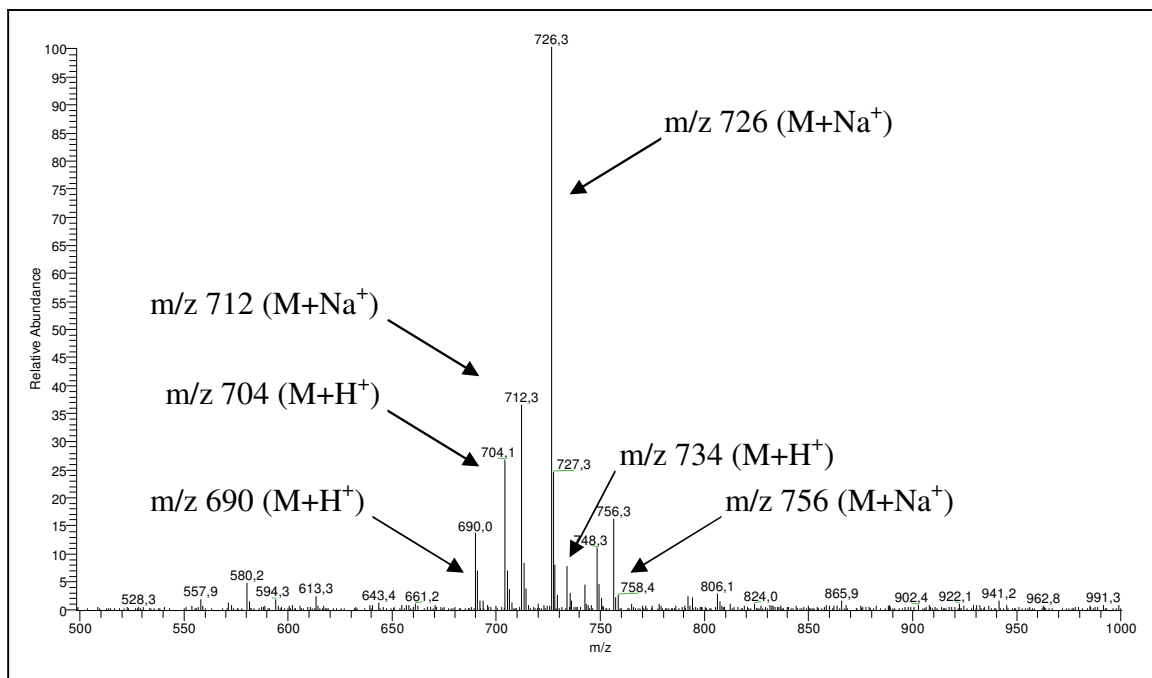


Abb.57: Gaschromatogramm zur Methylierungsanalyse von Aminex-Fraktion 7.

Bemerkenswert ist allerdings, dass im Gegensatz zur Analyse von Aminex-Fraktion 8 die terminale Hexoseeinheit in Pyranoseform nur in kleinen Anteilen mit einer Retentionszeit von 24,58 Minuten auszumachen ist.

Die massenspektrometrische Analyse der Aminex-Fractionen 6 und 5 zeigt neben den bereits erläuterten Ionenspuren, die noch anteilig in Aminex-Fraktion 6 zu beobachten sind, die Signale dreier weiterer Hydroxyprolin gebundener Glykane im Bereich von 690 bis 756 u in Form ihrer Natrium- und Wasserstoffaddukte (Abbildung 58).



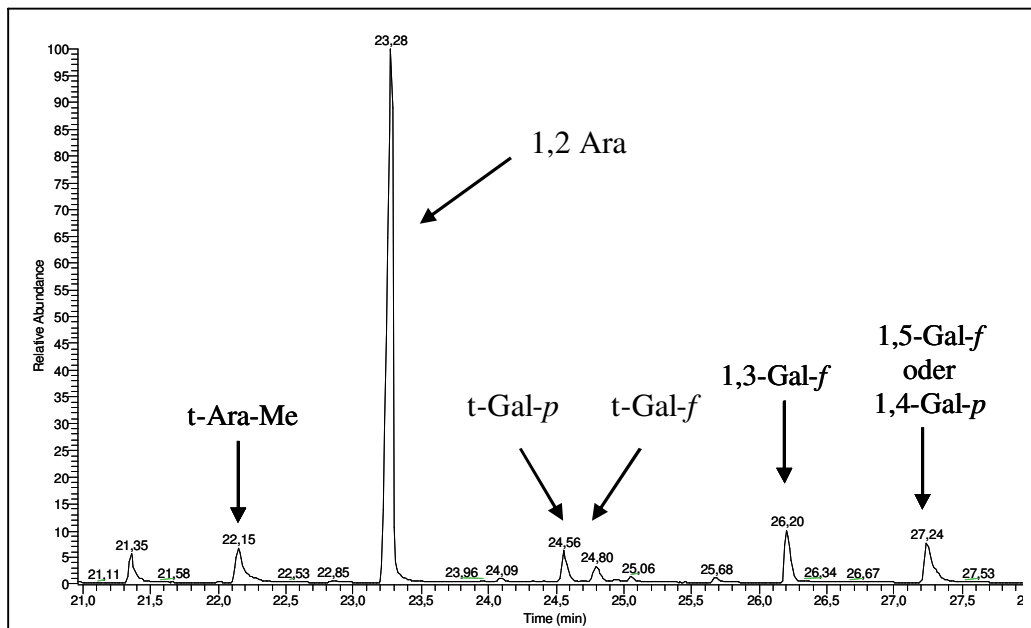
**Abb.58:** ESI-MS-Gesamtspektrum Hydroxyprolin gebundener Glykane aus Aminex-Fraktion 5.

Ausgehend von der Grundstruktur HypAra<sub>2</sub>Gal aus Aminex-Fraktion 7 ( $m/z$  580 ( $M+Na^+$ )) ergeben sich Verlängerungen der Glykankette um eine Pentoseeinheit auf  $m/z$  712 u ( $M+Na^+$ ), um eine methylierte Pentoseeinheit auf  $m/z$  726 ( $M+Na^+$ ) und um eine methylierte Hexoseeinheit auf  $m/z$  756 ( $M+Na^+$ ). Gleichzeitig zeigen ESI-MS-Stoßexperimente aber auch die Kettenverlängerung der methylierten Grundstruktur HypAra<sub>2</sub>GalMe(C<sub>6</sub>) um eine Hexoseeinheit auf ebenfalls  $m/z$  756 ( $M+Na^+$ ), so dass dieses Glykan zunächst in zwei verschiedenen Varianten zu beobachten ist. Die beobachteten Fragmentationen der HypGlykane der Aminex-Fractionen 5 und 6 sind nachstehend in Tabelle 8 zusammengefasst. Die dazugehörigen Stoßfragmentierungen sind dem Anhang ab Seite 148 beigelegt.

**Tabelle 8:** ESI-MS-Analyse von Aminex-Fraktion 5.

HypGlykan-Masse	Molekularion	Y-Fragmentionen [M+Na <sup>+</sup> ]	Sequenz
689 u	m/z 712 [M+Na <sup>+</sup> ] m/z 690 [M+H <sup>+</sup> ]	712 → 580 → 418 → 286 Y <sub>4</sub> Y <sub>3</sub> Y <sub>2</sub> Y <sub>1</sub>	Hyp-Ara <sub>2</sub> -Gal-Ara
703 u	m/z 726 [M+Na <sup>+</sup> ] m/z 704 [M+H <sup>+</sup> ]	726 → 580 → 418 → 286 Y <sub>4</sub> Y <sub>3</sub> Y <sub>2</sub> Y <sub>1</sub>	Hyp-Ara <sub>2</sub> -Gal-AraMe
733 u	m/z 756 [M+Na <sup>+</sup> ] m/z 734 [M+H <sup>+</sup> ]	756 → 580 → 418 → 286 Y <sub>4</sub> Y <sub>3</sub> Y <sub>2</sub> Y <sub>1</sub>	Hyp-Ara <sub>2</sub> -Gal-GalMe
		756 → 594 → 418 → 286 Y <sub>4</sub> Y <sub>3</sub> Y <sub>2</sub> Y <sub>1</sub>	Hyp-Ara <sub>2</sub> -GalMe-Gal

Aufgrund der Verlängerung der Glykankette der beiden Grundstrukturen erwartet man für die Methylierungsanalyse der Aminex-Fraktionen 5 und 6, neben den bereits beschriebenen Monomeren, eine entsprechende Zunahme an Signalen von nun kettenständigen Galaktoseeinheiten (Abbildung 59).

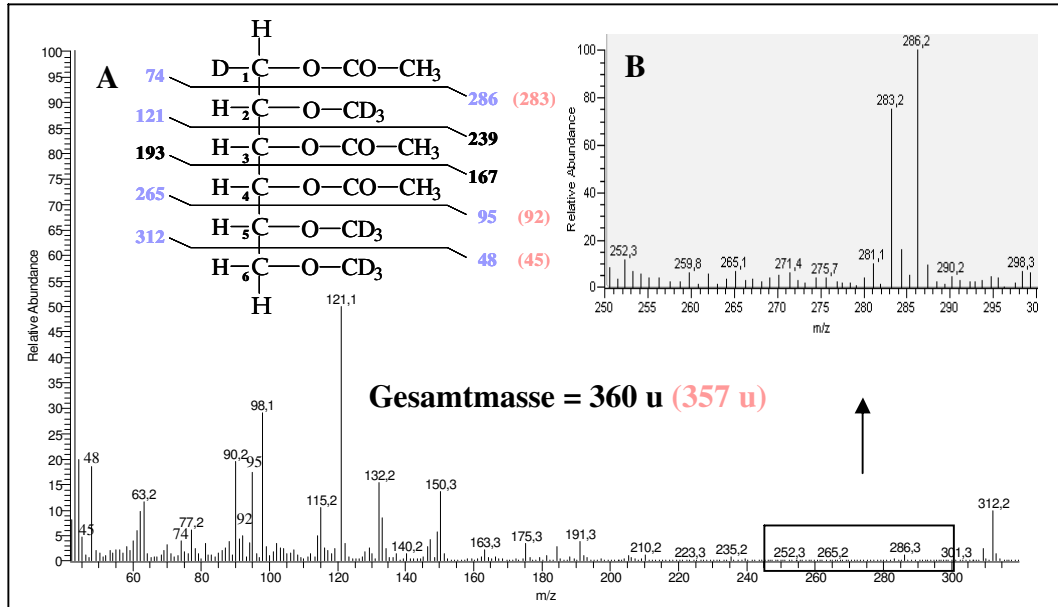


**Abb.59:** Gaschromatogramm zur Methylierungsanalyse von Aminex-Fraktion 5.

So treten neben den Signalen der bislang beschriebenen Zuckermonomere, deren Intensitäten mit Ausnahme der 1,2 verknüpften Arabinose stark abnehmen, drei neue Signale auf, von denen sich das Signal bei 22,15 Minuten als die aus der Analyse der Reinfractionen bekannte terminale, C<sub>3</sub>-methylierte Pentoseeinheit des Glykans einer Masse von 703 u identifizieren lässt. Bei den zwei weiteren Signalen der Retentionszeiten von 26,20 und 27,24 Minuten handelt es sich um die kettenständigen Hexoseeinheiten von denen das Signal bei 27,24 Minuten dem Glykan der Masse 703 u (HypAra<sub>2</sub>GalAraMe) zugeordnet wurde (Kapitel 2.2).



Das zweite, bislang unbekannte gaschromatographische bei Signal 26,20 Minuten aus Aminex-Fraktion 5 wird nachfolgend anhand seiner EI-Fragmentierung beschrieben (Abbildung 60).



**Abb.60:** EI-Fragmentierung bei 26,20 Minuten der Methylierungsanalyse von Aminex-Fraktion 5.

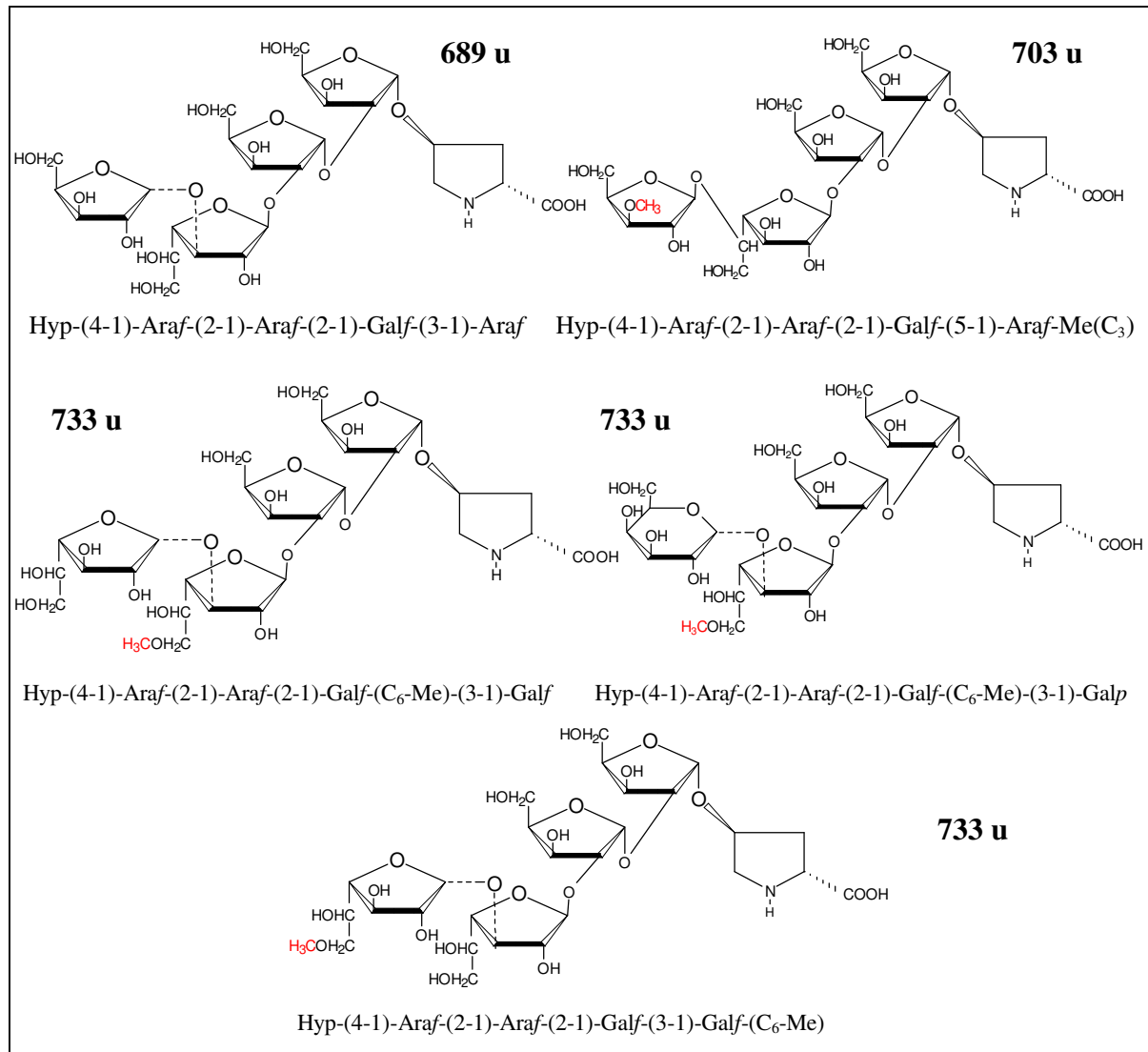
Die Ionenspuren bei  $m/z$  95 und  $m/z$  121 zeigen die Lage zweier Deuteromethylgruppen an den Kohlenstoffpositionen  $C_5$  und  $C_6$ , sowie einer Acetylgruppe und einer weiteren Deuteromethylgruppe an den Positionen  $C_1$  und  $C_2$ . Unter Berücksichtigung dieser Fragmente lassen sich durch die Fragmentionen bei  $m/z$  286 und  $m/z$  312 die beiden mittleren Positionen des Derivates als acetyliert nachweisen. Die Verbindung ergibt sich daher insgesamt als Derivat einer 1,3 verknüpften Galaktofuranose. Daneben lassen sich mit geringerer Intensität Ionenspuren bei  $m/z$  45 und  $m/z$  92 und  $m/z$  283 beobachten, die zeigen, dass dieses Zuckermonomer an Position  $C_6$  zum Teil methyliert vorliegt und zu diesem Anteil direkt aus der  $C_6$ -methylierten terminalen Galaktofuranoseeinheit der Grundstruktur HypAra<sub>2</sub>GalMe einer Masse von 571 u hervorgeht.

Die dominanten Hydroxyprolin gebundenen Glykane der Aminexfraktionen 5 und 6 tragen alle die zuvor beschriebenen kettenständigen Hexoseeinheiten. Die Analyse der Reifractionen aus Kapitel 2.2 hat darüber hinaus gezeigt, dass dem Glykan einer Masse von 703 u die kettenständige Hexoseeinheit der Retentionszeit von 27,24 Minuten zuzuordnen ist. Dabei handelt es sich um das Hexosemonomer, bei dem aufgrund der Derivatisierung nicht zwischen einer 1,5 verknüpften Galaktofuranose oder einer 1,4 verknüpften Galaktopyranose unterschieden werden konnte.

Aufgrund der nahezu gleich großen gaschromatographischen Anteile der beiden kettenverlängerten Hexosebestandteile bei der GC-MS-Analyse von Aminex-Fraktion 5 kann auch davon ausgegangen werden, dass die anderen dominanten Verbindungen dieser Fraktion, die Glykane der Massen 689 und 733 u, ausschließlich oder zu großem Anteil den zweiten kettenständigen Hexosebestandteil einer 1,3 verbundenen Galaktofuranoseeinheit tragen müssen.

Bezüglich der terminalen Hexoseeinheiten zeigt die GC-MS Analyse von Aminex-Fraktion 5, gaschromatographisch beide bereits beschriebenen Signale von terminaler Galaktopyranose und terminaler Galaktofuranose (Retentionszeiten von 24,56 und 24,80 Minuten). Dabei erklärt die EI-Fragmentierung der terminalen Galaktofuranose auch wieder anteilig die durch C<sub>6</sub>-Methylierung hervorgerufenen Fragmentationen. Für das Glykan der Masse 733 u ergeben sich, da kein weiteres Glykan dieser Fraktion über eine terminale Hexoseeinheit verfügt, insgesamt drei verschiedene Subtypen. Dabei handelt es sich um die durch eine methylierte Galaktofuranoseeinheit terminal abgeschlossene Grundstruktur HypAra<sub>2</sub>Gal und um die zwei durch eine Galaktofuranose oder Galaktopyranose terminal abgeschlossenen Glykane der methylierten Grundstruktur HypAra<sub>2</sub>GalMe.

Insgesamt enthalten die Aminex-Fractionen 5 und 6 demnach fünf Glykane, die sich wie in Abbildung 61 aufgeführt darstellen lassen.



**Abb. 61:** Hydroxyprolin gebundene Glykane der Aminex-Fractionen 5 und 6.

Bei den bisherigen Analysen Hydroxyprolin gebundener Glykane der Aminex-Fractionen 5 bis 8 konnten zwei kettenverlängerte Hexoseeinheiten ermittelt werden. Dabei handelt es sich um die 1,3 verbundenen Galaktofuranoseeinheiten der HypGlykane einer Masse von 689 und 733 u, sowie um die Galaktoseeinheit des Glykans einer Masse von 703 u, bei der aufgrund der Positionierung der Seitengruppen bei der Methylierungsanalyse nicht entschieden werden kann, ob es sich um eine Galaktose in Pyranose- oder in Furanoseform handelt. Dass aber auch terminale Hexopyranosen kettenverlängert werden, zeigt die Methylierungsanalyse von Aminex-Fraktion 4. Abbildung 62 zeigt hierzu zunächst das ESI-MS-Gesamtspektrum dieser Fraktion.



Die bei der ESI-MS<sup>n</sup>-Fragmentierung dieser Verbindung entstehenden Y-Fragmentationen sind in Tabelle 9 aufgeführt, das dazugehörige MS<sup>2</sup>-Spektrum ist dem Anhang auf Seite 152 beige-fügt.

HypGlykan-Masse	Molekularion	Y-Fragmentionen [M+Na <sup>+</sup> ]	Sequenz
719 u	m/z 742 [M+Na <sup>+</sup> ] m/z 720 [M+H <sup>+</sup> ]	742 → 580 → 418 → 286 Y <sub>4</sub> Y <sub>3</sub> Y <sub>2</sub> Y <sub>1</sub>	Hyp-Ara <sub>2</sub> -Gal-Glu

70

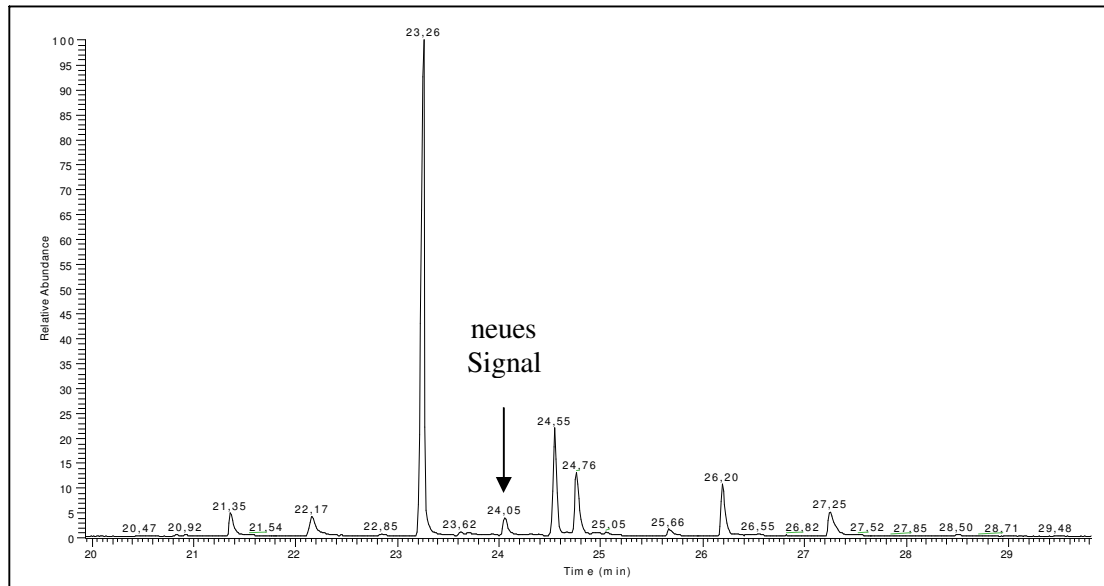


Abb. 63: Gaschromatogramm zur Methylierungsanalyse von Aminex-Fraktion 4.

Die in Abbildung 64 aufgeführte EI-Fragmentierung zum Zeitpunkt von 24,05 Minuten zeigt dabei die charakteristischen Ionenspuren des Derivates einer kettenständigen Hexoseeinheit in Pyranosekonfiguration.

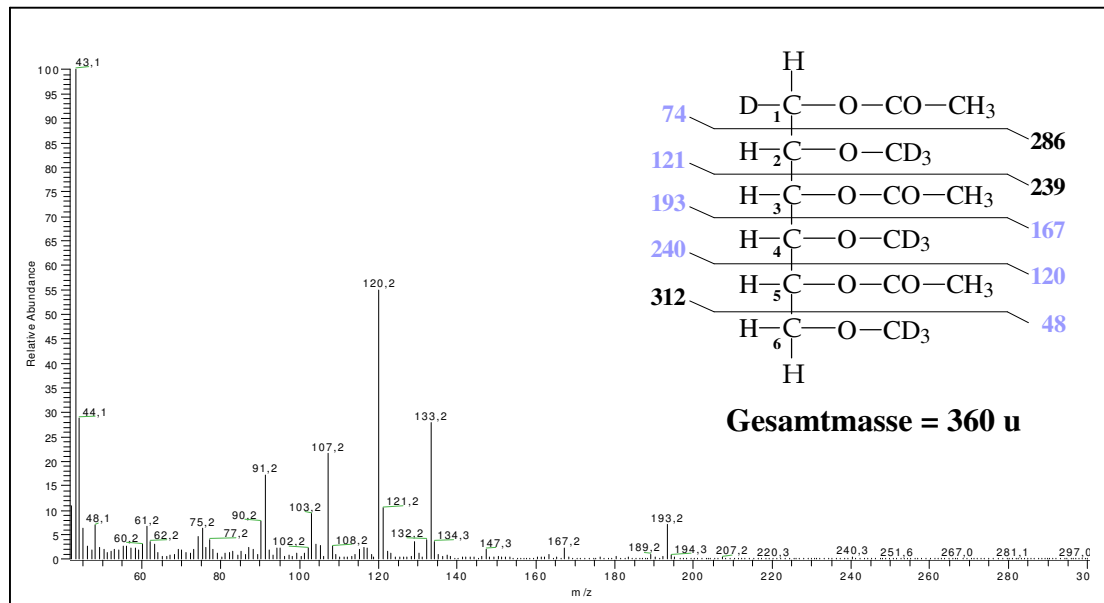


Abb. 64: EI-Fragmentierung bei 24,05 Minuten der Methylierungsanalyse von Aminex-Fraktion 4.

Im Gegensatz zur EI-Fragmentierung 1,3 verbundener Hexofuranose bleibt hier ein Signal bei m/z 95 aus. Stattdessen lässt sich ein Signal bei m/z 120 beobachten, das unter Berücksichtigung der Ionenspur bei m/z 48 die acetylierte Position C<sub>5</sub> des Derivates und damit die Position des Ringschlusses der nativen Verbindung darstellt. Darüber hinaus ergeben sich die Verknüpfungspositionen dieser Monomereinheit durch die Ionenspuren bei m/z 48, m/z 121 und m/z 193 an den Kohlenstoffpositionen C<sub>1</sub> und C<sub>3</sub>, so dass sich dieses Zuckermonomer insgesamt als Derivat einer 1,3 verbundenen Hexopyranose ergibt.

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Untersuchung der Verbindung einer Masse von 719 u aus Aminex-Fraktion 4 ergibt sich durch die gaschromatographische Analyse der trimethylsilylierten Zuckeralditole zur Bestimmung der Monomereinheiten dieser Fraktion (Abbildung 65).

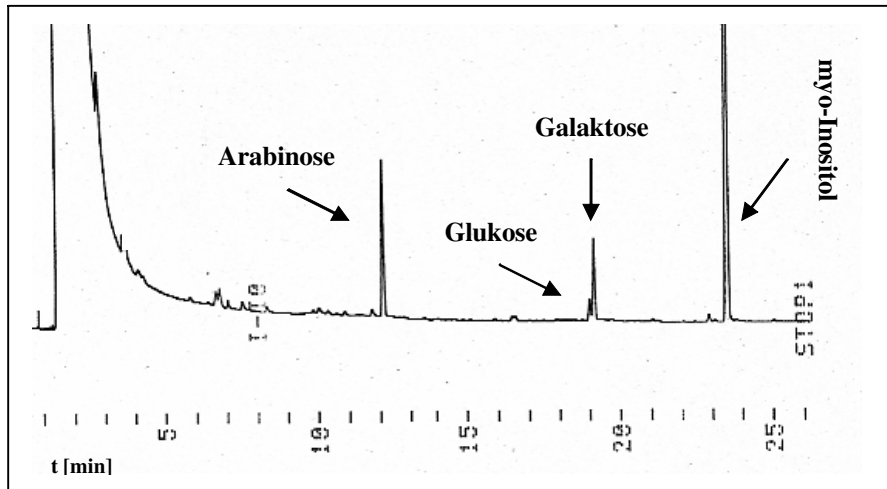


Abb. 65: GC-Analyse der Monomereinheiten aus Aminex-Fraktion 4.

Das Gaschromatogramm zeigt, dass Aminex-Fraktion 4, neben den bislang ausschließlich beobachteten Monomerbestandteilen Arabinose und Galaktose mit kleinerem Anteil auch Glukose enthält. Darüber, ob die Glukose aber auch gleichzeitig dem Glykan einer Masse von 719 u zuzuordnen ist, kann an dieser Stelle zunächst nur spekuliert werden. Andererseits zeigt die gaschromatographische Analyse zur Monomerzusammensetzung der nächst größeren HypGlykane aus Aminex-Fraktion 3, dass der Anteil an Glukose im Vergleich zu Fraktion 4 deutlich zunimmt (Abbildung 66).

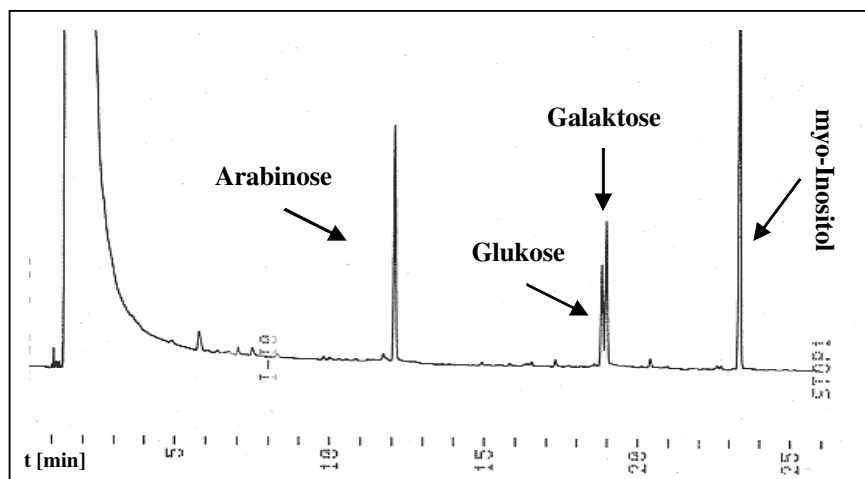
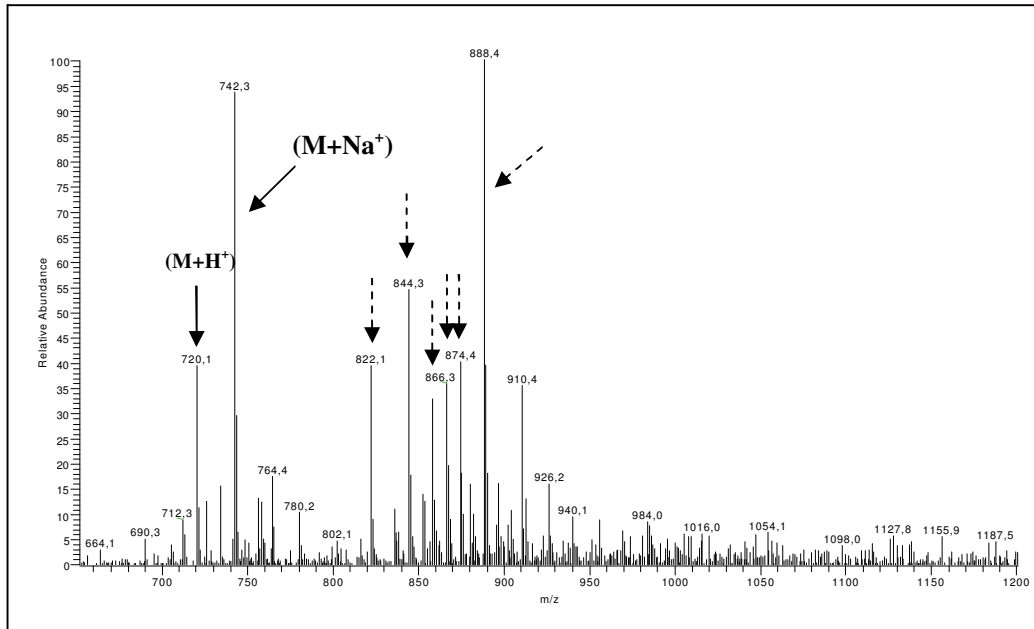


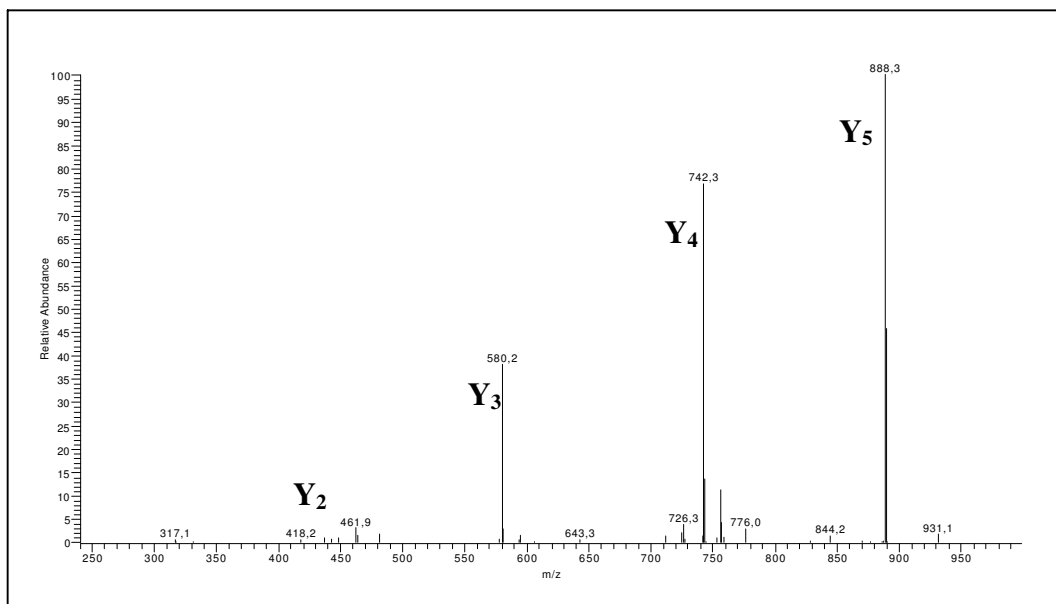
Abb. 66: GC-Analyse der Monomereinheiten von Aminex-Fraktion 3.

Gleichzeitig zeigt auch die massenspektrometrische Analyse von Aminex-Fraktion 3 einen deutlichen Anstieg der Signalintensität der neuen Verbindung einer Masse von 719 u (Abbildung 67).



**Abb. 67:** ESI-MS-Gesamtanalyse Hydroxyprolin gebundener Glykane aus Aminex-Fraktion 3

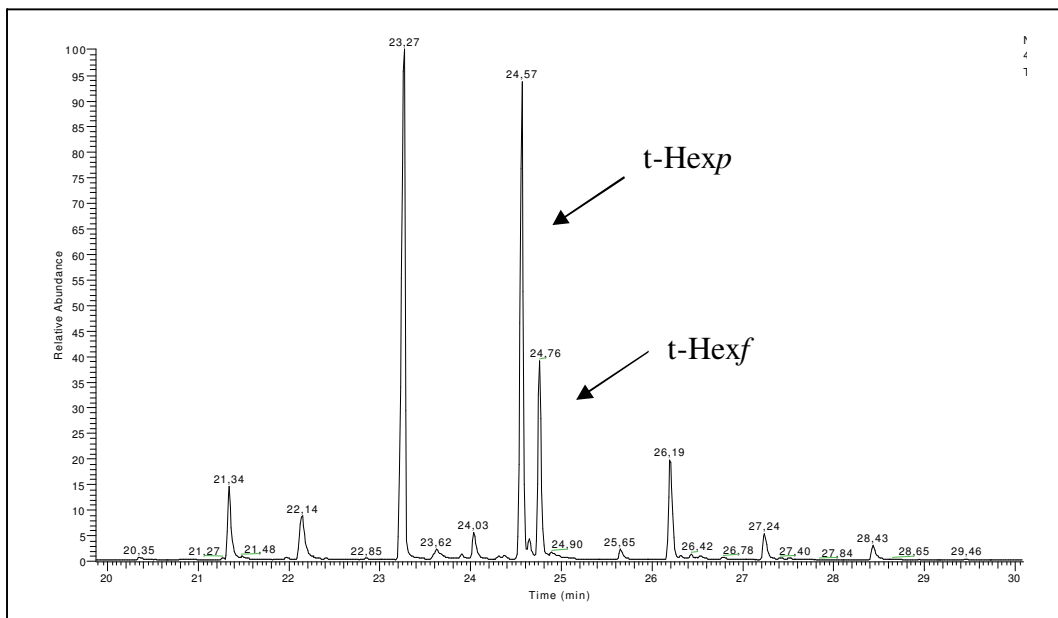
Daneben treten die Ionenspuren dreier weiterer Glykane im Bereich von 800-900 u auf (gestrichelte Pfeile), von denen die Verbindung mit der größten Ionenspur bei m/z 888 ( $M+Na^+$ ) selber aus einem Glykan einer Masse von 719 u hervorgeht. Den Beleg hierfür liefert die ESI-MS<sup>2</sup>-Stoßfragmentierung des Ions bei m/z 888, die in Abbildung 68 dargestellt ist.



**Abb. 68:** ESI-MS<sup>2</sup>-Experiment des linearen Hydroxyprolin gebundenen Glykans einer Masse von 865 u (888  $M+Na^+$ ) aus Aminex-Fraktion 3.

Die Fragmentierung zeigt den charakteristischen linearen Verlust einer methylierten Pentoseeinheit (146 u) und führt so direkt auf eine Ionenspur bei  $m/z$  von 742 ( $M+Na^+$ ,  $Y_4$ ) zurück. Der hohe Anteil von Einheiten eines entsprechenden Molekulargewichtes von 719 u und der gleichzeitige Anstieg an Glukose bei der gaschromatographischen Analyse von Aminex-Fraktion 3 lassen daher annehmen, dass das Hydroxyprolin gebundene Glykan einer Masse von 719 u terminal von einer Glukoseeinheit abgeschlossen wird.

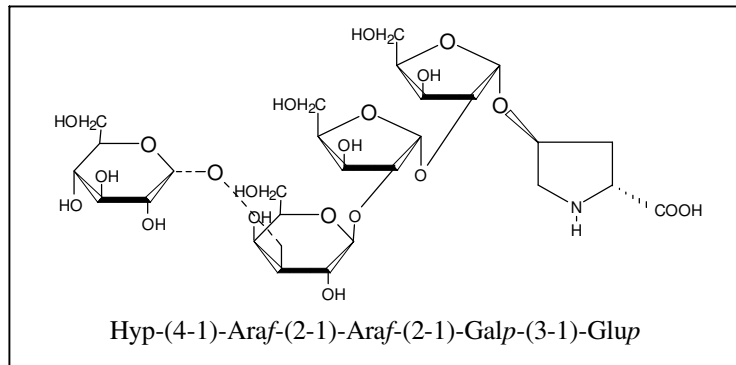
Gemessen an dem hohen Anteil der Verbindung an der Gesamtzusammensetzung von Aminex-Fraktion 3 erwartet man bei der Methylierungsanalyse dieser Fraktion darüber hinaus einen entsprechenden Anstieg der terminalen Hexoseeinheiten. Abbildung 69 zeigt das Gaschromatogramm zur Methylierungsanalyse von Aminex-Fraktion 3.



**Abb. 69:** Gaschromatogramm zur Methylierungsanalyse von Aminex-Fraktion 3.

So nehmen die Intensitäten der Signale dieser terminalen Hexoseeinheiten mit den Retentionszeiten von 24,57 und 24,76 Minuten deutlich zu. Auffallend ist hierbei auch der große Anteil an terminaler Hexopyranose im Vergleich zu den Methylierungsanalysen der kleineren Hydroxyprolin gebundenen Glykane, so dass davon auszugehen ist, dass zumindest ein großer Anteil des Glykans einer Masse von 719 u eine terminale Glukopyranose trägt und sich das HypGlykan daher wie nachstehend abgebildet darstellen lässt (Abbildung 70).





**Abb. 70:** Hydroxyprolin gebundenes Glykan einer Masse von 719 u.

Daneben ist aber auffällig, dass das gaschromatographische Signal bei 24,03 Minuten der GC-MS-Analyse von Aminex-Fraktion 3 trotz des erhöhten Anteils der Verbindung einer Masse von 719 u im Vergleich zu Aminex-Fraktion 4 nicht mit erwartet höherer Signalintensität zu beobachten ist. Somit kann angenommen werden, dass auch dieses HypGlykan in verschiedenen massegleichen Isoformen vorliegt, deren Strukturen jedoch nicht abgeleitet werden können.

Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, dass alle Hydroxyprolin gebundenen Glykane aus *Chlamydomonas reinhardtii* aus der Grundstruktur HypAra<sub>2</sub>Gal hervorgehen. Diese Grundstruktur wird durch verschiedene Pentose- und Hexoseeinheiten zu den zuvor dargestellten Tetraoligosacchariden im Massenbereich von 700 u kettenverlängert. Bei den nächst größeren Hydroxyprolin gebundenen Glykanen aus Aminex-Fraktion 3 handelt es sich nach massenspektrometrischer Analyse wie zuvor dargestellt um HypGlykane der Massen von 821, 851 und 865 u. Eine Zuweisung bestimmter Zuckermonomere zu bestimmten Verbindungen kann aufgrund der zunehmenden Komplexität der größeren Glykane von diesem Zeitpunkt an nicht mehr vorgenommen werden. Dies liegt vor allem daran, dass die Aminex-Fractionen 1 bis 3 der größeren Verbindungen neben der Galaktose einen gleich bleibend hohen Glukoseanteil aufweisen, so dass bei diesen Glykanen nicht entschieden werden kann, welches Hexosemonomer welche genaue Kettenposition einnimmt. Die Ursache hierfür liegt darin, dass gleichartig verbundene und daher gleichartig derivatisierte Glukose- oder Galaktosemonomere bei der Methylierungsanalyse gaschromatographisch nahezu identische Retentionszeiten besitzen und über ihre Hauptfragmentationen nicht zu unterscheiden sind.

Außerdem liegen die größeren Hydroxyprolin gebundenen Glykane aus *Chlamydomonas* zum Teil in verzweigter Form vor und können so durch ESI-MS<sup>n</sup>-Experimente über ihre Fragmentationen nicht von einem Gemisch mehrerer isobarer Formen mit unterschiedlichem Kettenaufbau unterschieden werden.

Die Methylierungsanalyse von Aminex-Fraktion 3 zeigt die Signale zweier verzweigter Monomerbestandteile zu den Retentionszeiten von 25,65 und 28,43 Minuten. Die EI-Fragmentierung zum Zeitpunkt 25,65 Minuten zeigt dabei die Ionenspuren einer 1,2,5 verbundenen Arabinoseeinheit (Abbildung 71).

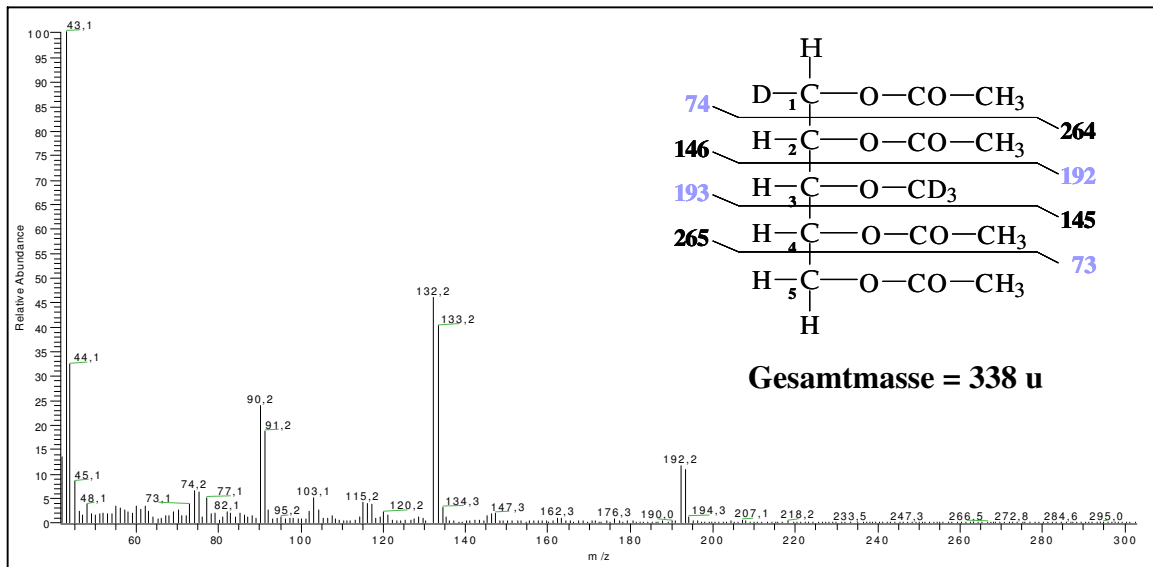


Abb. 71: EI-Fragmentierung bei 25,65 Minuten der Methylierungsanalyse von Aminex-Fraktion 3.

Unter Berücksichtigung der Hauptfragmentionen bei m/z 73 und m/z 74 sowie zweier McLafferty Fragmente bei m/z 132 und m/z 133 beschreiben zwei weitere Hauptfragmentionen bei m/z 192 und m/z 193 die Lage von insgesamt vier Acetylgruppen einer Pentoseeinheit an den Kohlenstoffpositionen C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>4</sub> und C<sub>5</sub>.

Die EI-Fragmentierung zum Zeitpunkt von 28,43 Minuten zeigt aber auch, dass neben den verzweigten Arabinosemonomeren auch die Hexoseeinheiten der größeren Hydroxyprolin gebundenen Glykane verzweigt werden (Abbildung 72).

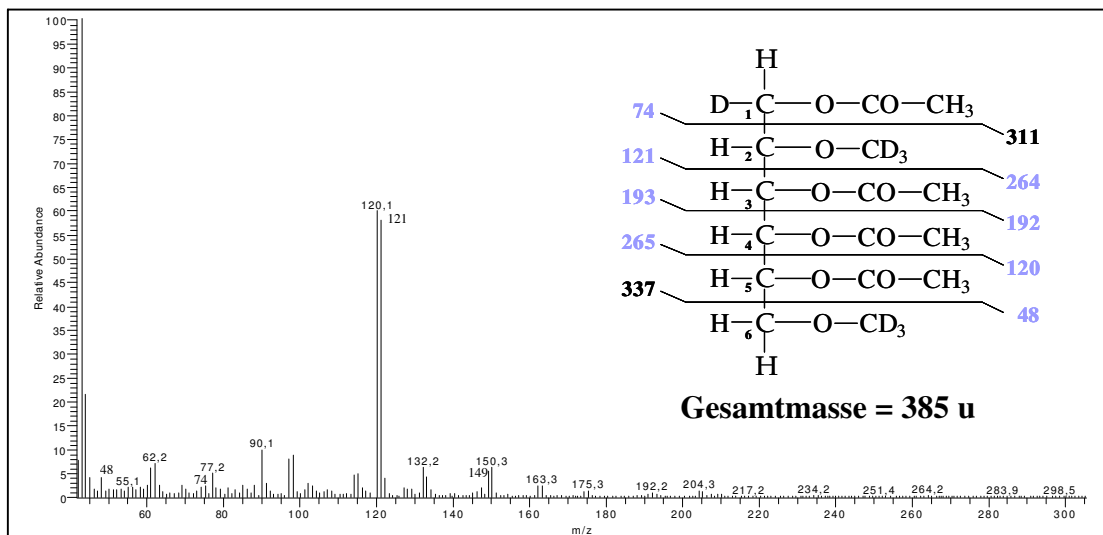


Abb. 72: EI-Fragmentierung bei 28,43 Minuten der Methylierungsanalyse von Aminex-Fraktion 3.

Die Fragment-Ionen bei  $m/z$  120 und  $m/z$  121 beschreiben unter Berücksichtigung der Signale bei  $m/z$  48 und  $m/z$  74 die Lage zweier Acetylgruppen an den Positionen  $C_1$  und  $C_5$ . Die Kohlenstoffpositionen  $C_3$  und  $C_4$  tragen außerdem zwei weitere Acetylgruppen. Zwar sind die zur Beschreibung dieser Positionierung nötigen Hauptfragmentationen bei  $m/z$  192, 193 und 264 kaum auszumachen, jedoch zeigen die Ionenspuren bei  $m/z$  162 und  $m/z$  163 sowie  $m/z$  149 und  $m/z$  150 charakteristische McLafferty-Umlagerungen jeweils einer Acetylgruppe von  $C_3$  auf  $C_2$  und von  $C_4$  auf  $C_5$ .

Das Derivat trägt daher insgesamt vier Acetylgruppen an den Kohlenstoffpositionen  $C_1$ ,  $C_3$ ,  $C_4$  und  $C_5$ . Ob es sich bei der untersuchten Verbindung um eine 1,3,4 verknüpfte Hexopyranose handelt oder um das Derivat einer 1,3,5 verknüpften Hexofuranose kann aufgrund der genannten Problematik der nicht eindeutigen Seitengruppenpositionierung bei Acetylierung der Positionen  $C_4$  und  $C_5$  nicht entschieden werden (vgl. Kapitel 2.2.4).

Die Untersuchung der größten Hydroxyprolin gebundenen Glykane der Aminex-Fractionen 1 und 2 umfasst Verbindungen mit einem Molekulargewicht von 983 u bis 1645 u und einer Kettenlänge von 6 bis 11 Zuckermomeren.

Die gaschromatographische Analyse der Aminex-Fractionen 1 und 2 zeigt einen gleichbleibend hohen Anteil an Glukose im Vergleich zur Untersuchung von Aminex-Fraktion 3. Die Methylierungsanalyse dieser größten Verbindungen der *Chlamydomonas* Aufarbeitung zeigt aber zwei weitere wesentliche Unterschiede zu den bisher gezeigten Analysen (Abbildung 73).

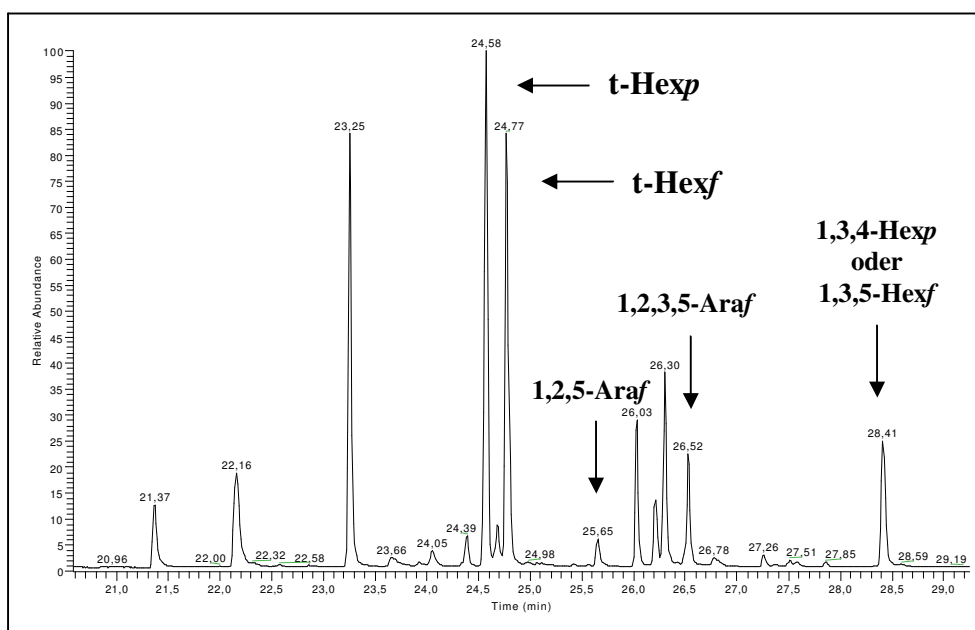


Abb. 73: Gaschromatogramm zur Methylierungsanalyse von Aminex-Fraktion 1.

Zum einen nimmt der relative Anteil an terminalen Hexoseeinheiten noch einmal deutlich zu, wodurch gezeigt werden kann, dass die größeren Hydroxyprolin gebundenen Glykane mit großem Anteil durch Hexoseeinheiten beider Ringkonfigurationen (Pyranose, Furanose) abgeschlossen sind. Daneben steigt gleichzeitig aber auch der Anteil und die Vielzahl an verzweigten Zuckermonomeren. So lassen sich neben den bereits erläuterten Signalen 1,3,4 oder 1,3,5 verknüpfter Hexoseeinheiten ( $R_t = 28,41$  min) und 1,2,4 verknüpfter Pentoseeinheiten ( $R_t = 25,65$  min) mit einer Retentionszeit von 26,52 Minuten auch vollständig acetylierte Derivate von komplett verzweigten Arabinoseeinheiten ermitteln (EI-Fragmentierung im Anhang).

In Tabelle 10 werden zum Ende des Kapitels die bei der Analyse der Gesamtpräparation Hydroxyprolin gebundener Glykane aus *Chlamydomonas reinhardtii* ermittelten Monomerbestandteile anhand der bei der Methylierungsanalyse festgestellten Retentionszeiten zusammengefasst.

**Tabelle 10:** Monomerbestandteile der Hydroxyprolin gebundenen Glykane aus *Chlamydomonas reinhardtii*. Bezüglich der Hexosemonomere kann ab einem Molekulargewicht von 800 u aufgrund der erläuterten Problematik des hohen Glukoseanteils der größeren Verbindungen nicht mehr entschieden werden, welche Kettenposition der Galaktose und welche der Glukose zuzuordnen ist.

gaschromatogr. Retentionszeit [min]	Zuckermonomer
21,37	t-Araf
22,16	t-Araf-Me(C <sub>3</sub> )
23,25	1,2 Araf
24,04	1,3 Hexp
24,58	t-Hexp
24,77	t-Hexf + t-Hexf-Me(C <sub>6</sub> )
25,65	1,2,5 Araf
26,03	1,2 Hexp
26,20	1,3 Hexf + 1,3 Hexf-Me(C <sub>6</sub> )
26,52	1,2,3,5 Araf
27,26	1,4 Hexp oder 1,5 Hexf
28,41	1,3,4 Hexp oder 1,3,5 Hexf

### 2.3.1 Zusammenfassung der Analyse einer Gesamtpräparation Hydroxyprolin gebundener Glykane aus *Chlamydomonas reinhardtii*

Die Analyse einer Gesamtpräparation Hydroxyprolin gebundener Glykane der vegetativen Zellwand von *Chlamydomonas reinhardtii* hat gezeigt, dass alle untersuchten Verbindungen die für höhere Pflanzen charakteristischen ersten beiden an Hydroxyprolin 1,2 gebundenen Arabinoseeinheiten tragen. Stossfragmentierungsexperimente zeigen zusätzlich, dass mit Ausnahme der kürzesten Glykane der Massen von 263 und 395 u alle Verbindungen eine Hexoseeinheit als drittes Kettenglied besitzen. Dabei handelt es sich um eine Galaktoseeinheit, die in zwei verschiedenen Ringkonfigurationen vorliegt, als Hexopyranose oder in der für Pflanzen ungewöhnlichen Hexofuranoseform. Ausgehend von dieser Grundstruktur HypAra<sub>2</sub>Gal ergeben sich definierte Kettenverlängerungen um weitere Pentose- und Hexoseeinheiten, die zum Teil einfach methyliert vorliegen. Dabei lässt sich beobachten, dass grundsätzlich Hexosebestandteile beider Ringkonfigurationen kettenverlängert werden. Bei der Untersuchung der methylierten Monomereinheiten fällt aber auch auf, dass von den Hexosebestandteilen Hydroxyprolin gebundener Glykane aus *Chlamydomonas reinhardtii* nur Monomere in Furanoseform Methylgruppen tragen.

Die Kombination von ESI-MS, GC und Methylierungsanalyse erlaubt eine direkte Zuweisung der identifizierten Monomerbestandteile zu den Hydroxyprolin gebundenen Glykanen bis zu einer Kettengröße von vier Zuckermomeren. Der Gewinn an Informationen ist dabei so groß, dass an späterer Stelle (Kapitel 3.4) auf die Biosynthese der kürzeren linearen Hydroxyprolin gebundenen Glykane zurück geschlossen werden kann.

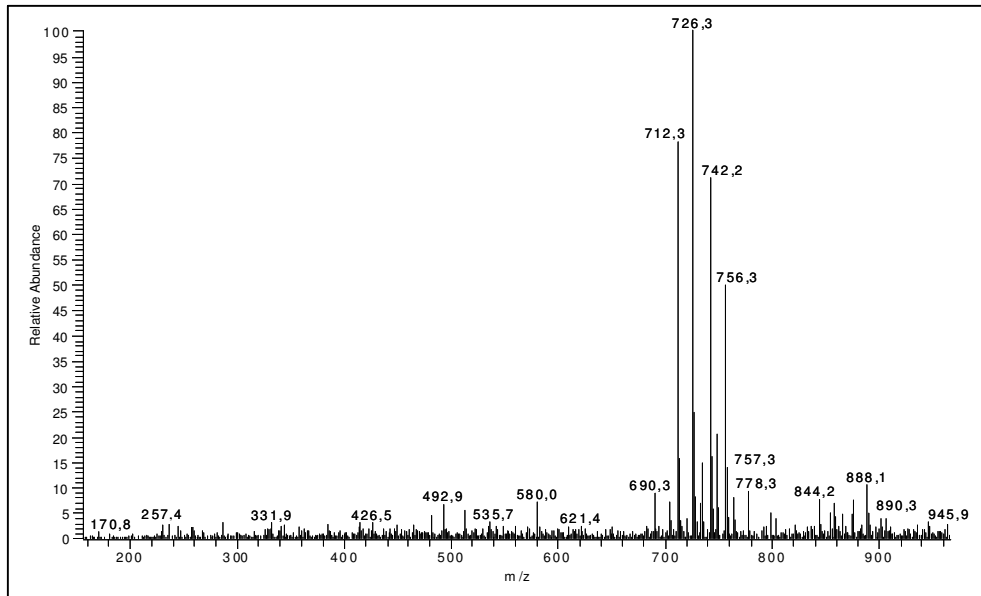
Ab einer Kettengröße von vier Monomereinheiten lässt sich im Vergleich zu den kleineren Glykanen, die sich ausschließlich aus Arabinose und Galaktose zusammensetzen, ein weiterer Monomerbestandteil, die Glukose, beobachten. Neben einem gleich bleibend hohen Anteil an Glukose tragen die größeren Hydroxyprolin gebundenen Glykane der Aminex-Fractionen 1 bis 3 zum Teil auch verzweigte Monomereinheiten. Gleichzeitig steigt aber auch der Anteil an terminalen Hexoseeinheiten beider Ringkonfigurationen, so dass hier letztlich gezeigt wird, dass der überwiegende Anteil der größeren Hydroxyprolin gebundenen Glykane durch diese Hexoseeinheiten terminal abgeschlossen wird.

## 2.4 Hydroxyprolin gebundene Glykane aus *Chlamydomonas incerta*

Neben den Analysen der *Chlamydomonas reinhardtii* Zellwandpräparationen wurden, in Zusammenarbeit mit Julia Warnau einer Diplomandin der Arbeitsgruppe, zusätzliche Studien an einer weiteren *Chlamydomonas* Art, an *Chlamydomonas incerta*, durchgeführt. Beide *Chlamydomonas* Arten liegen evolutiv betrachtet etwa 500 Millionen Jahre auseinander [51], so dass der direkte Vergleich ihrer Glykosylierungsstrategien zeigen sollte, ob es sich bei der für *Chlamydomonas reinhardtii* ermittelten Grundstruktur HypAra<sub>2</sub>Gal, sowie den Galaktoseeinheiten in der seltenen Furanosekonfiguration um charakteristische Merkmale nur einer Art oder der ganzen Gattung *Chlamydomonas* handelt.

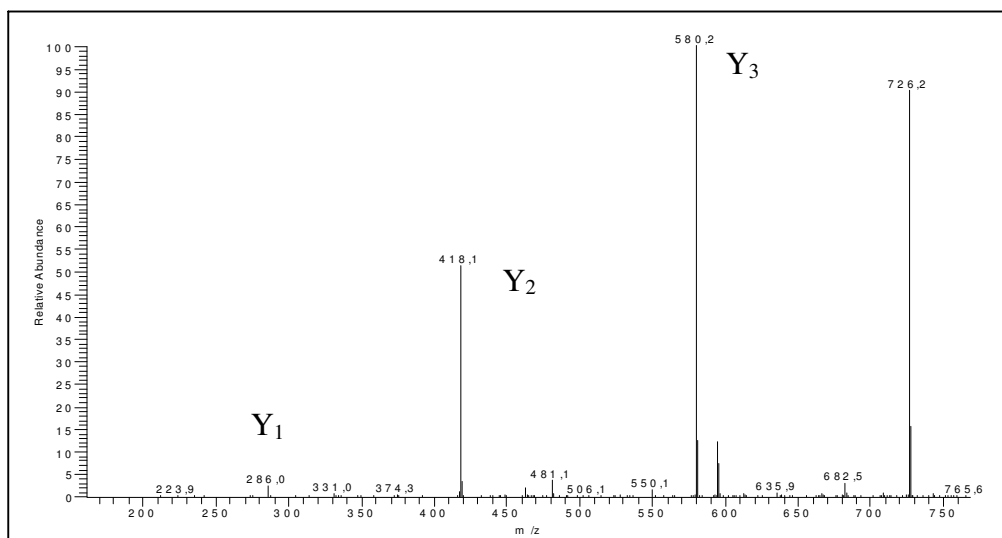
Die Präparation und die Analyse der aus *Chlamydomonas incerta* isolierten Verbindungen erfolgte dabei genau so wie in Kapitel 2.3 für die Glykane aus *Chlamydomonas reinhardtii* beschrieben. Bereits die massenspektrometrische Untersuchung der durch Aminex-Kationenaustauschchromatographie erhaltenen Signalfractionen zeigt den hohen Verwandtschaftsgrad der beiden *Chlamydomonas* Arten. Insgesamt lassen sich bei der ESI-MS-Analyse Hydroxyprolin gebundener Glykane aus *Chlamydomonas incerta* alle bei *Chlamydomonas reinhardtii* bereits beobachteten Molekularionen Hydroxyprolin gebundener Glykane wiederfinden. Die massenspektrometrische Analyse der *Incerta*-Glykane zeigt daneben auch die Ionenspuren der unbekannten Glykanverbindungen, die bei der Stoßfragmentierung das unbestimmte Aglykon bei  $m/z$  176 zeigen (s. Kapitel 2.2).

Abbildung 74 zeigt hierzu exemplarisch die ESI-MS-Analyse von Aminex-Fraktion 4 der *Chlamydomonas incerta* Aufarbeitung.



**Abb. 74:** ESI-MS-Gesamtspektrum von Aminex-Fraktion 4 der *Chlamydomonas incerta* Aufarbeitung.

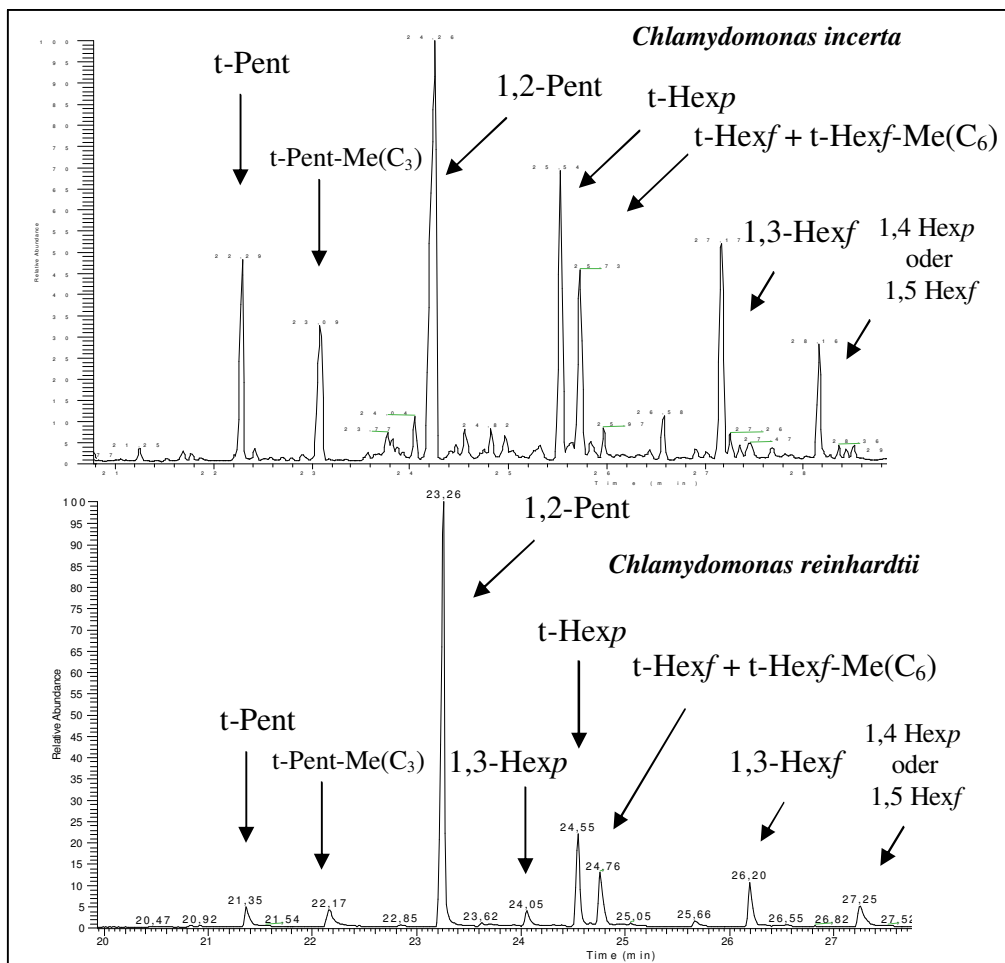
Zu sehen sind die Molekularionen von vier Hydroxyprolin gebundenen Glykanen mit den  $m/z$  Verhältnissen von 712 bis 756 ( $M+Na^+$ ) und somit alle Verbindungen einer Kettenlänge von vier Zuckermomeren, die zuvor auch bei der Untersuchung der *Chlamydomonas reinhardtii* Glykane beobachtet und strukturell beschrieben wurden. Auch die ESI-MS<sup>2</sup>-Stoßfragmentierungen dieser vier Verbindungen zeigt, ebenso wie bei *Chlamydomonas reinhardtii*, den linearen und gleichartigen Aufbau dieser Verbindungen bezüglich der Sequenzfolge der Pentose- und Hexosebestandteile. Abbildung 75 zeigt hierzu exemplarisch die Stoßfragmentierung der aus der Analyse der Reinfractionen von *Chlamydomonas reinhardtii* bekannten Verbindung einer Gesamtmasse von 703 u ( $726 M+Na^+$ ).



**Abb. 75:** ESI-MS<sup>2</sup>-Stoßfragmentierung eines Hydroxyprolin gebundenen Glykans einer Masse von 703 u ( $726 M+Na^+$ ) aus Aminex-Fraktion 4 der *Chlamydomonas incerta* Zellwandpräparation.

Die ESI-MS<sup>2</sup>-Fragmentierung zeigt den Verlust einer methylierten Pentoseeinheit einer Masse von 146 u und führt so auf das als Grundeinheit der *Chlamydomonas reinhardtii* Glykane bekannte Tochterion einer Masse von 580 u ( $M+Na^+$ ,  $Y_3$ ) zurück. Dabei zeigt die Stoßfrag-mentierung aller aus *Chlamydomonas incerta* analysierter HypGlykane die charakteristischen Fragmentionen bei  $m/z$  418 und  $m/z$  286 (jeweils  $M+Na^+$ ,  $Y_2$  und  $Y_1$ ). Diese Ionenspuren belegen, dass auch die Sequenzfolge der Monomereinheiten dieser Grundeinheit mit zwei an Hydroxyprolin gebundenen Pentoseeinheiten und einer daran verbundenen Hexoseeinheit genau der für *Chlamydomonas reinhardtii* ermittelten Grundstruktur HypAra<sub>2</sub>Gal entspricht.

Neben den massenspektrometrischen Untersuchungen, bei denen sich kein qualitativer Unterschied beider Arten feststellen ließ, zeigt auch die Methylierungsanalyse der Aminex-Fractionen beider *Chlamydomonas* Arten die gleichartige Verknüpfung der einzelnen Monomerbausteine untereinander. Abbildung 76 zeigt hierzu vergleichend die Gaschromatogramme der Methylierungsanalysen der Aminex-Fractionen 4 beider Organismen. Die Identifizierung der Monomerbestandteile erfolgte dabei in allen Fällen wie für *Chlamydomonas reinhardtii* ausführlich dargestellt über EI-Fragmentierungsexperimente.

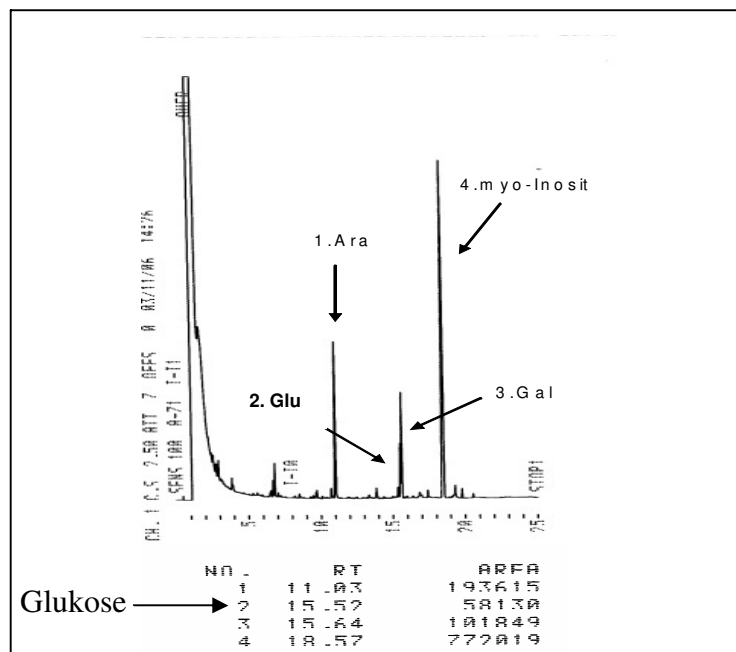


**Abb. 76:** Gaschromatogramme zur Methylierungsanalyse der beiden Aminex-Fractionen 4 aus *Chlamydomonas reinhardtii* und *Chlamydomonas incerta* im Vergleich.



Ebenso wie die Hydroxyprolin gebundenen Glykane aus *Chlamydomonas reinhardtii* besitzen die entsprechenden Verbindungen aus *Chlamydomonas incerta* lediglich einen unverzweigten kettenständigen Pentosebestandteil einer 1,2 verbundenen Pentoseeinheit. Außerdem tragen die aus *Chlamydomonas incerta* angereicherten Glykane mit vergleichbarem Anteil Hexoseeinheiten in der besonderen Ringkonfiguration einer Hexofuranose. Darüber hinaus zeigen auch alle über GC-MS untersuchten Aminex-Fractionen keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der beobachteten Monomerbestandteile der beiden Organismen.

Auch die gaschromatographische Analyse der trimethylsilylierten Zuckeralditole zur Identifizierung von Zuckermonomeren der *Incerta* Glykane zeigt keinen Unterschied zur Analyse der *Chlamydomonas reinhardtii* Glykane. So setzen sich die kleineren linearen Hydroxyprolin gebundenen Glykane aus *Chlamydomonas incerta* bis zu einer Gesamtmasse von 571 u ausschließlich aus den Monomerbestandteilen Arabinose und Galaktose zusammen. Auch die größeren Verbindungen beider Organismen unterscheiden sich nicht in ihrer Monomerzusammensetzung. So konnte bei den entsprechenden Verbindungen aus *C. incerta* ebenso wie in Kapitel 2.3 für *C. reinhardtii* gezeigt, ebenfalls die Glukose als weiterer Hexosebestandteil dieser größeren Verbindungen bestätigt werden (Abbildung 77).



**Abb. 77:** Gaschromatogramm zur Bestimmung der Monomerbestandteile von Aminex-Fraktion 4 aus *Chlamydomonas incerta*.

#### 2.4.1 Zusammenfassung zur Analyse Hydroxyprolin gebundener Glykane aus *Chlamydomonas incerta*

Die Hydroxyprolin gebundenen Glykane der vegetativen Zellwand von *Chlamydomonas incerta* zeigen strukturell ein hohes Maß an Übereinstimmung im Vergleich zu den entsprechenden Verbindungen aus *Chlamydomonas reinhardtii*. So zeigen alle massenspektrometrischen Analysen der durch Aminex-Kationenaustauschchromatographie fraktionierten HypGlykane beider Organismen vergleichbare Spektren. Dieses gilt im Bezug auf die Gesamtzusammensetzung der Aminex-Fractionen aber auch für die ESI-MS-Stossfragmentierung der einzelnen Verbindungen. So tragen alle Hydroxyprolin gebundenen Glykane aus *Chlamydomonas incerta* auch die für *Chlamydomonas reinhardtii* ermittelte Grundstruktur HypAra<sub>2</sub>Gal.

Auch die Methylierungsanalyse der *Incerta* Glykane zeigt, dass die Hydroxyprolin gebundenen Glykane der zwei Algenarten gleichartig verbundene Monomereinheiten tragen. Daneben beinhalten die Verbindungen aus *Chlamydomonas incerta* zum Teil auch die Hexoseeinheiten in der besonderen Ringkonfiguration der Hexofuranose.

Zudem zeigt auch die gaschromatographische Analyse der trimethylsilylierten Zuckeralditole der nach saurer Hydrolyse erhaltenen Monomerbestandteile keinen Unterschied in der Glykosylierung beider *Chlamydomonas*-Arten. Die kleineren Verbindungen setzen sich ausschließlich aus Arabinose und Galaktose zusammen. Die größeren HypGlykane aus *C. incerta* setzen sich, ebenso wie bei *C. reinhardtii*, zusätzlich auch aus Glukoseeinheiten zusammen.

## 2.5 Glykosylierungsunterschiede im Zellzyklus von *Chlamydomonas reinhardtii*

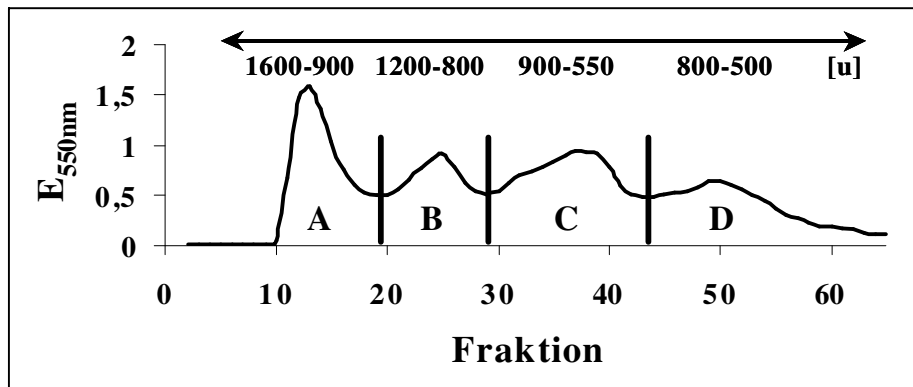
Der Vergleich der *Chlamydomonas* Glykane zu den entsprechenden Verbindungen HypAra<sub>3</sub> und HypAra<sub>4</sub> aus *Arabidopsis thaliana* zeigt viele Gemeinsamkeiten in der Glykosylierung von Grünalgen und höheren Pflanzen. Daneben ergeben die Untersuchungen aber auch die wesentlich höhere Komplexität der *Chlamydomonas* Glykane im Bezug auf die Kettenlänge, dem Kettenaufbau und der Verwendung von unterschiedlichen Monomerbausteinen. Ein höheres Maß an Komplexität ist in biologischen Systemen auch immer mit einem höheren Maß an Funktionalität verbunden, so dass grundsätzlich davon ausgegangen werden kann, dass die Hydroxyprolin gebundenen Glykane der Zellwand von *Chlamydomonas* im Vergleich zu höheren Pflanzen ein größeres Aufgabenspektrum erfüllen.

Die Zellwand der Grünalge muss im Verlauf eines Zellzyklus mehrfach ab- und umgebaut werden. An der Umstrukturierung der *Chlamydomonas*-Wand, die sich ausschließlich aus Hydroxyprolinreichen Glykoproteinen zusammensetzt, sind bestimmte Proteasen beteiligt, die hochspezifisch zwischen verschiedenen Zellwandtypen unterscheiden können (Kapitel 1.4). Um die hohe Spezifität dieser Proteasen zu gewährleisten, müssen sich die Zellwände zu den verschiedenen Wachstumszeitpunkten qualitativ voneinander unterscheiden.

Die hohe Spezifität des V-Lysins auf die Glykoproteine GP2 und GP3 der Sporangienzellwand wurde von Waffenschmidt gezeigt [31,33]. Bei diesen Studien konnte sie gleichzeitig zeigen, dass sich die Aminosäurezusammensetzungen von Sporangien- und Zoosporenzellwänden nicht voneinander unterscheiden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die unterschiedlichen Anteile der einzelnen Zellwandglykoproteine zu den verschiedenen Wachstumszeitpunkten unverändert bleiben. Die hohe Spezifität des V-Lysins auf die Glykoproteine der Sporangienzellwände lässt daher vermuten, dass eine strukturelle Veränderung der Zellwand im vegetativen Fortpflanzungszyklus auf der Ebene der Kohlenhydrateinheiten stattfinden muss. So zeigen gaschromatographische Analysen der sauren Hydrolysate der isolierten Glykoproteine beider Zellstadien deutliche Unterschiede in ihrem Galaktose- zu Arabinoseverhältnis [33,60,61]. Im nachfolgenden Kapitel werden die Hydroxyprolin gebundenen Glykane aus Zellwänden von Sporangien und Zoosporen zweier Entwicklungsstadien des vegetativen Regenerationszyklus vergleichend untersucht.

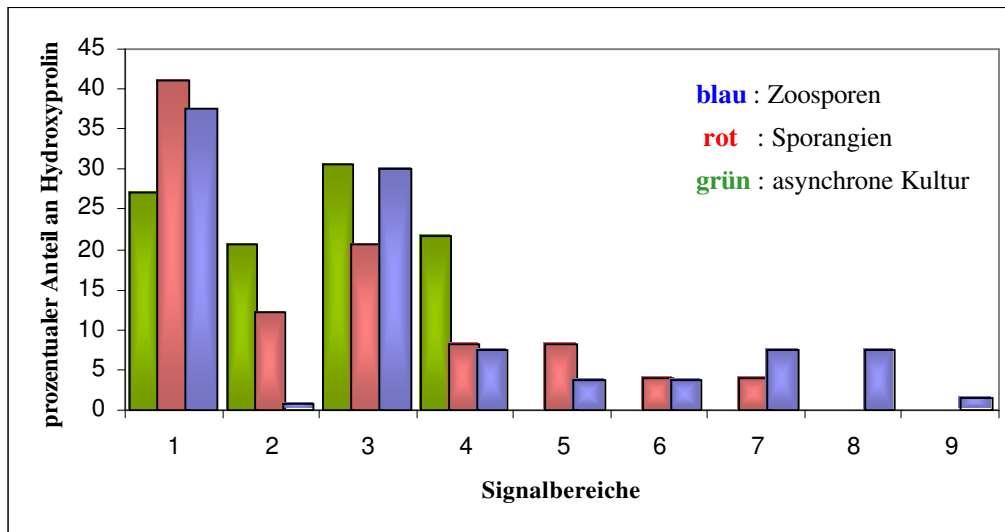
Bei den verwendeten Sporangien- und Zoosporenkulturen handelte es sich um synchrone Zellkulturen, deren Wachstumsphasen ständig lichtmikroskopisch kontrolliert wurden. Die Daten wurden daneben mit den zuvor bei der Analyse der Reinfractionen in Kapitel 2.2 gewonnenen Ergebnissen verglichen. Zu den Zellen aus Kapitel 2.2 muss angemerkt werden, dass es sich hierbei nicht um eine synchronisierte Kultur handelte. Daher ist davon auszugehen, dass sich nur wenige Zellen dieser asynchronen Zell-Kultur zum Zeitpunkt der Ernte in einem reifen Sporangien oder in einem Zoosporen Stadium befanden. Die gleichzeitige Untersuchung einer asynchronen Kultur soll daher im Vergleich zu den synchron geernteten Sporangien- und Zoosporen-Zellen die Stadienspezifität der nachfolgend dargestellten Ergebnisse verdeutlichen.

Zur Analyse wurden die alkalischen Hydrolysate der Sporangien- und Zoosporenaufarbeitungen, wie zuvor beschrieben über Aminex-Kationenaustauschchromatographie vorfraktioniert. Zum direkten Vergleich der Sporangien- und Zoosporenpräparationen mit den asynchronen Zellen wurde der ursprüngliche „steilere“ Laufmittelgradient verwendet. Die Verwendung dieses Gradienten zeigte zuvor bei den Präparationen der Zellen aus Kapitel 2.2 ein Aminex-Elutionsprofil mit den vier Signalbereichen A-D (Abbildung 78).



**Abb. 78:** Kationenaustauschchromatographie der Zellwandhydrolysate asynchroner *Chlamydomonas reinhardtii* Zellen aus Kapitel 2.2.

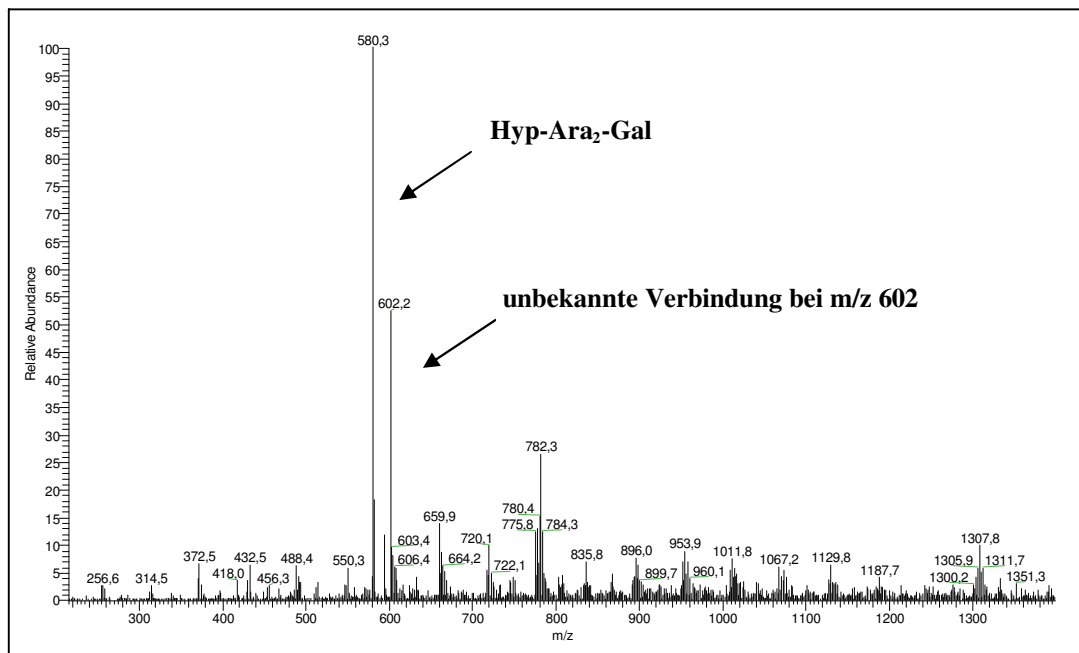
Die Elutionsprofile der Sporangien- und Zoosporenaufarbeitungen zeigen ein komplexeres Bild. Abbildung 79 zeigt hierzu die Laufschemata in Form der prozentualen Verteilung von Hydroxyprolin bei gleicher Aminex-Fraktionierung der Zellwandhydrolysate von asynchronen Zellen, Sporangien und Zoosporen.



**Abb. 79:** Verteilung von Hydroxyprolin in %, in die Signalbereiche 1-9 von Sporangien und Zoosporen bei gleicher Aminex-Fraktionierung.

Die Fraktionierung der ersten vier Signale entspricht dabei genau den in Kapitel 2.2 gebildeten Fraktionen A-D (grün dargestellt). Insgesamt lassen sich bei der Analyse der Sporangien- und Zoosporenaufarbeitungen zu späteren Elutionszeitpunkten aber weitere Fraktionen bilden. Bei der Sporangienaufarbeitung ergeben sich letztlich sieben, bei der Zoosporenaufarbeitung neun Signalbereiche, deren Fraktionen jeweils zur weiteren Analyse vereinigt wurden. Dabei unterscheiden sich die relativen Anteile an Hydroxyprolin im Vergleich der Wachstumsstadien untereinander deutlich.

Bereits die massenspektrometrische Analyse der gebildeten Sporangien- und Zoosporenfraktionen zeigte einige Besonderheiten, denn von diesen Fraktionen ließen sich nur in den Sporangienfraktionen 1 bis 4 die aus der Analyse der asynchronen Kultur bekannten Signale Hydroxyprolin gebundener Glykane feststellen. In diesen Fraktionen lassen die Molekularionen aller in den Kapiteln zuvor beschriebener *Chlamydomonas*-Glykane bestimmen. Auch die Stoßfragmentierungen der Verbindungen zeigen die bekannten Ionenspuren der zuvor untersuchten Hydroxyprolin gebundenen Glykane. Die übrigen Sporangienfraktionen und alle Zoosporenfraktionen zeigen bei der ESI-MS-Analyse gestaffelte Signalanordnungen, die zu einem späterem Zeitpunkt erläutert werden. Der Vergleich der MS-Gesamtspektren der Sporangienfraktionen 1 bis 4 mit den entsprechenden Fraktionen A-D der asynchronen Zellen aus Kapitel 2.2 zeigt neben den Signalen bekannter HypGlykane zunächst einen anderen bemerkenswerten Unterschied (Abbildung 80).



**Abb. 80:** ESI-MS-Gesamtspektrum von Aminex-Fraktion 4 der Sporangienzellwandpräparation.

Das ESI-MS-Gesamtspektrum von Aminex-Fraktion 4 der Sporangienpräparation trägt als Hauptbestandteil die bekannte Grundeinheit HypAra<sub>2</sub>Gal. Außerdem besitzt die Fraktion aber einen auffällig hohen Anteil der Verbindung bei m/z von 602, einer der Verbindungen, aus denen bei ihrer Stoßfragmentierung das unbekannte Fragmention bei m/z 176 hervorgeht. Die unbekannten Verbindungen wurden zuvor bei der Analyse der asynchronen Kulturen zwar auch beobachtet, jedoch zeigen die ersten vier Sporangienfraktionen alle einen deutlich erhöhten Anteil an diesen Komponenten. Der hohe Anteil dieser speziellen Verbindungen in den Sporangienfraktionen 1 bis 4 ist bemerkenswert, denn bei der ESI-MS-Analyse der übrigen Aminex-Fractionen, der Sporangienfraktionen 5 bis 7 und aller Zoosporen-Fractionen fällt eine Besonderheit auf (Abbildung 81).

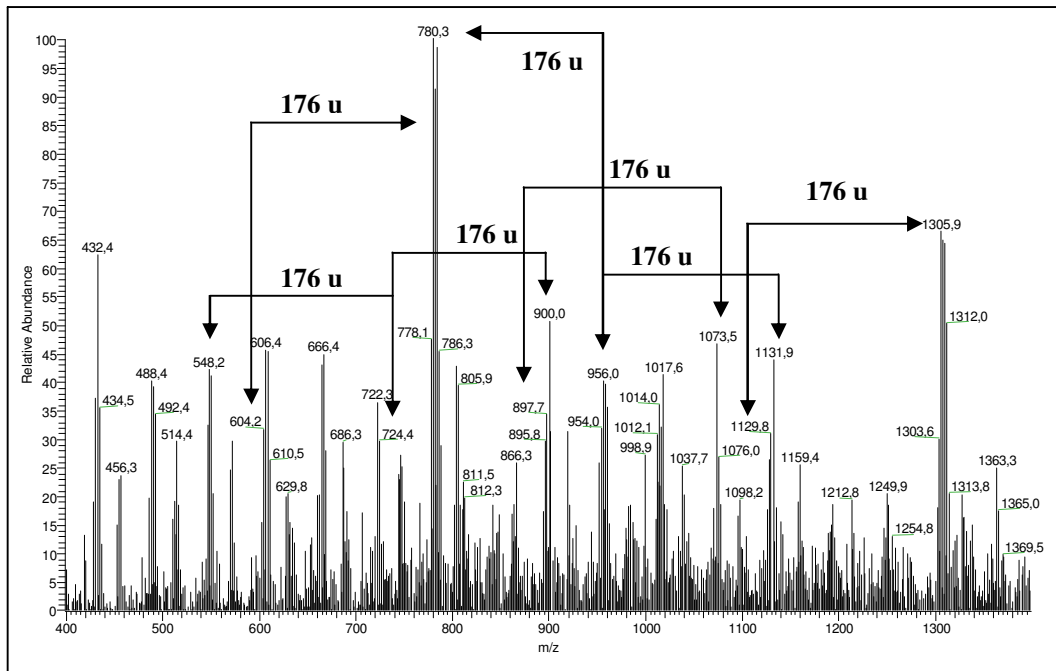
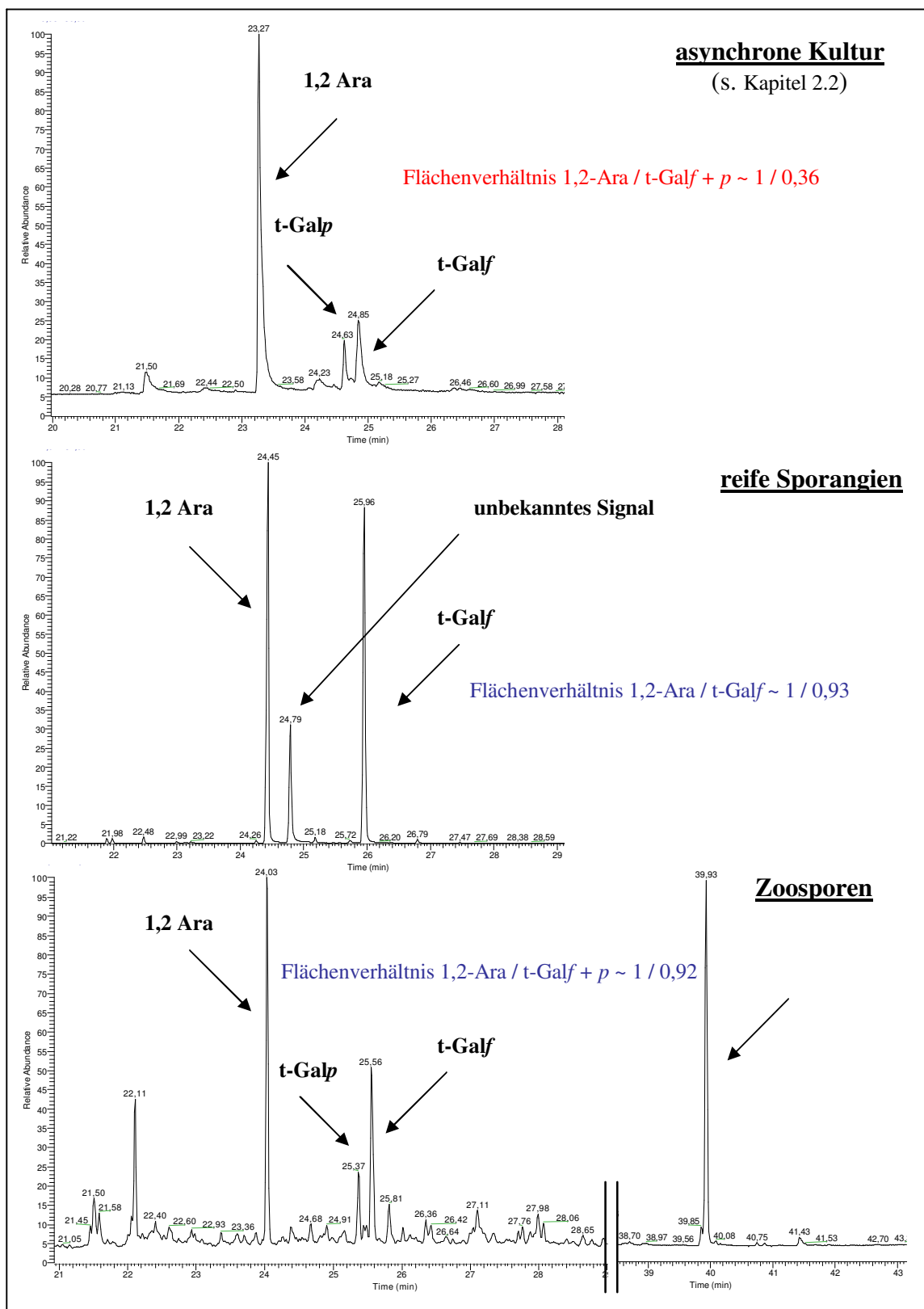


Abb. 81: ESI-MS-Gesamtspektrum von Aminex-Fraktion 7 einer Sporangienzellwandpräparation.

Die Sporangienfraktionen 5 bis 7 und alle Zoosporenfraktionen zeigen massenspektrometrisch alle eine Reihe von gestaffelten Signalen verschiedenster m/z-Verhältnisse. In der Staffelung der dominanten Signale zeigt sich, dass bei allen Signalanhäufungen in einem Abstand von 176 Masseinheiten eine weitere Signalanhäufung auftritt. Dieser Befund legt dabei die Vermutung nahe, dass es sich bei den gestaffelt auftretenden Signalen um den Effekt einer Umstrukturierung Hydroxyprolin gebundener Glykane während der vegetativen Fortpflanzung von *Chlamydomonas reinhardtii* handelt.

Sollte also tatsächlich ein Umbau der Zellwand im Wachstumszyklus von *Chlamydomonas* auf Ebene der Kohlenhydrateinheiten stattfinden, dann muss sich der zuvor beschriebene Befund auch bei der Untersuchung der Monomereinheiten durch Methylierungsanalysen wieder finden lassen.

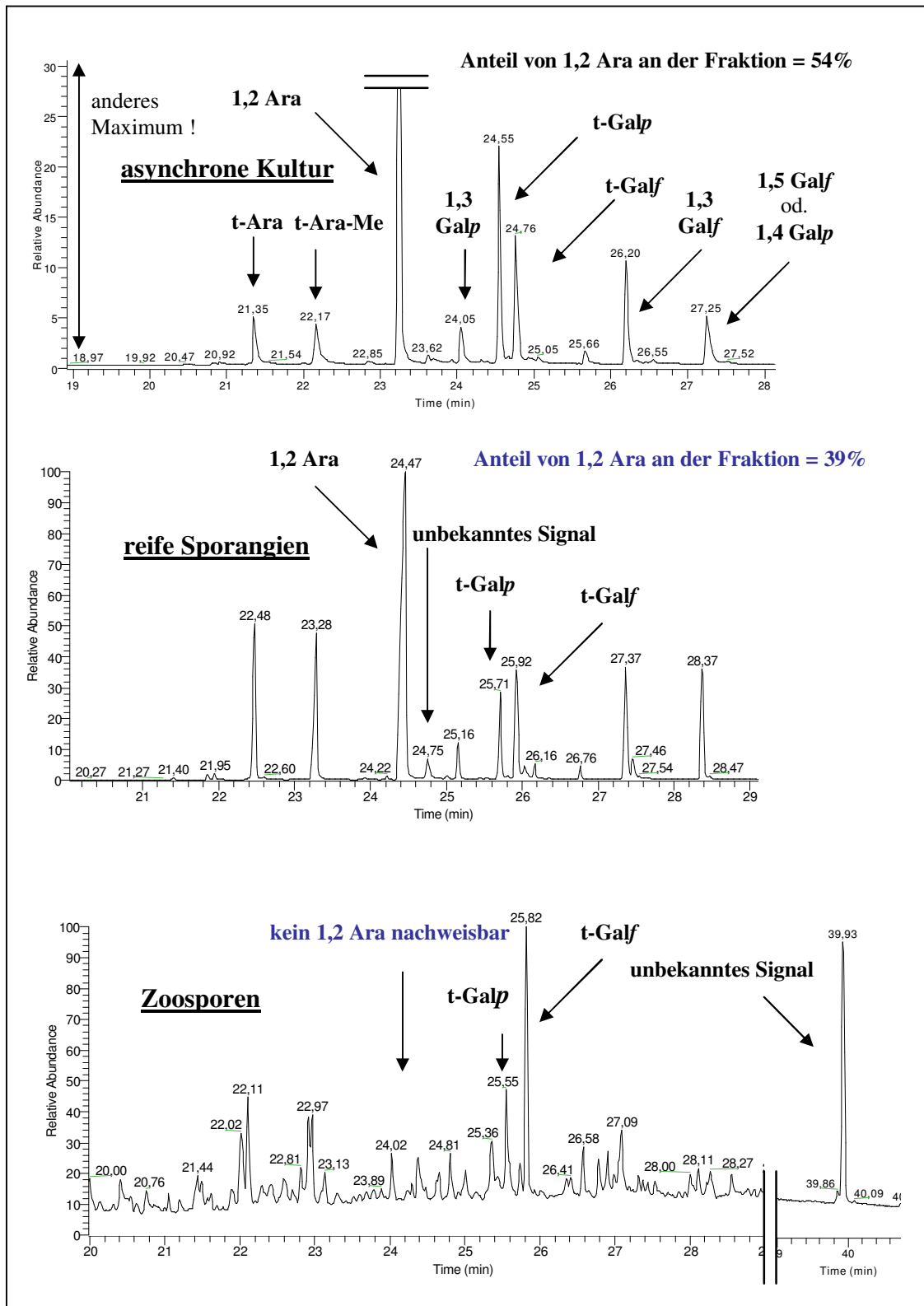
Abbildung 82 zeigt zunächst im Vergleich die Methylierungsanalysen der beiden Aminex-Fractionen 4 der Sporangien- und Zoosporenaufarbeitung mit der entsprechenden Aminex-Fraktion D der asynchronen Zellkultur aus Kapitel 2.2. Dabei handelt es sich um die Sporangien-Fraktion für die wie zuvor dargestellt bei der ESI-MS Analyse, neben der Grundeinheit HypAra<sub>2</sub>Gal, ein deutlich erhöhter Anteil einer unbekannten Verbindung eines Masse zu Ladungsverhältnisses von m/z 602 beobachtet wurde.



**Abb. 82:** Gaschromatogramme von Methylierungsanalysen der Aminex-Fractionen 4 von Sporangien und Zoosporen sowie Fraktion D der asynchronen Zellen (Kapitel 2.2). Die absoluten Retentionszeiten der drei Messreihen treten methodisch bedingt zeitversetzt auf.



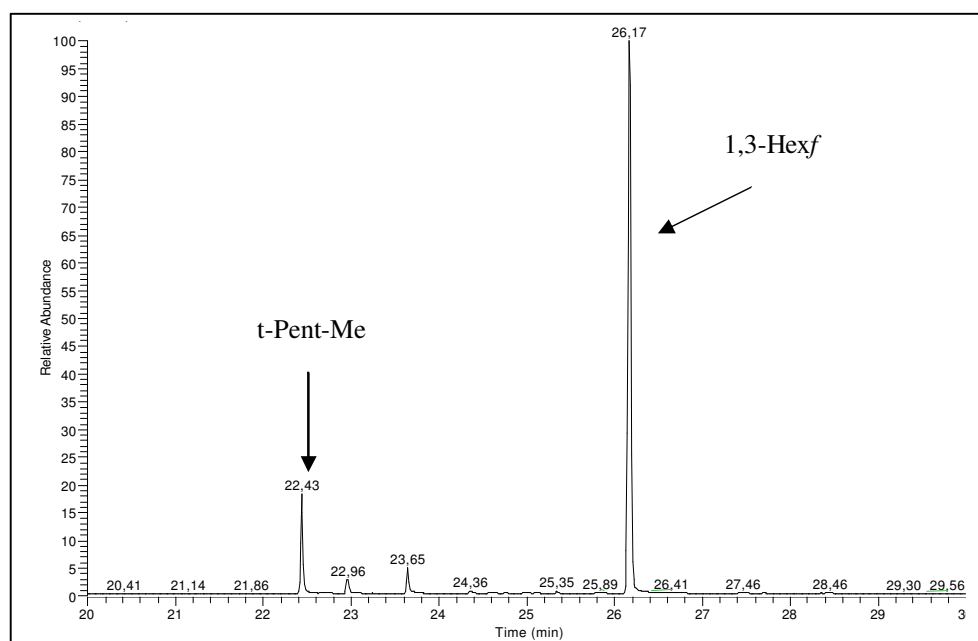
Ebenso wie die massenspektrometrische Analyse zeigt auch die Methylierungsanalyse von Sporangienfraktion 4 (Abb. 82, mitte) ein neuartiges Signal bei einer Retentionszeit von 24,79 Minuten. Die EI-Fragmentierung zu diesem Zeitpunkt zeigt ein komplexes Spektrum bei dem nur bei einem Teil der beobachteten Ionenspuren ein struktureller Hintergrund vermutet werden kann. So treten einige der bekannten Fragmentationen der zuvor beschriebenen Glykanderivate auf, darüber hinaus lässt sich die zugrunde liegende Struktur aber nicht bestimmen. Auch die Methylierungsanalyse der entsprechenden Zoosporen Fraktion weist gaschromatographisch ein weiteres Signal auf. Zwar lässt sich das GC-Signal bei 24,79 Minuten im Vergleich zu der Sporangienaufarbeitung nicht mehr beobachten, dafür tritt zu einem deutlich späteren Zeitpunkt, bei 39,93 Minuten ein neues Signal auf, aus dessen komplexem EI-Spektrum ebenfalls keine genaue Struktur abgeleitet werden kann. Neben diesen unbekannten auftretenden GC-Signalen zeigen sich im Vergleich der drei Wachstumsstadien untereinander zwei weitere Besonderheiten. Zum einen lässt sich bei der Untersuchung dieser Sporangienfraktion kein Signal für terminale Hexopyranose feststellen. Betrachtet man daneben die Signalflächenverhältnisse der 1,2 verbundenen Arabinoseeinheiten und von terminaler Galaktose in diesen Fraktionen, so fällt auf, dass sowohl Sporangien- als auch Zoosporenglykane anteilig wesentlich weniger 1,2 verbundene Arabinosemonomere besitzen als die Zellen der asynchronen Kultur. Die anteilige Abnahme an kettenständigen Arabinoseeinheiten und das gleichzeitige Auftreten neuartiger Signale bei der Untersuchung von gleich fraktionierten Sporangien- und Zoosporen-Präparationen lässt vermuten, dass bestimmte Arabinoseeinheiten im Verlauf des Zellzyklus modifiziert werden müssen. Vergleicht man die Methylierungsanalysen der nächst größeren Verbindungen der Aminex-Fraktionen 1 bis 3 der Sporangien- und Zoosporenaufarbeitung, sowie der Aminex-Fraktionen A-C der Analyse der vegetativen Zellen miteinander, so erhärtet sich dieser Verdacht. Abbildung 83 zeigt hierzu exemplarisch die Methylierungsanalyse der Aminex-Fraktionen 3 der Sporangien- und Zoosporen-Aufarbeitung sowie von Aminex-Fraktion C aus Kapitel 2.2. Die Analysen der ersten beiden Aminex-Fraktionen zeigen den gleichen Befund.



**Abb. 83:** Gaschromatogramme von Methylierungsanalysen der Aminex-Fractionen 3 von Sporangien und Zoosporen sowie Fraktion C der asynchronen Zellen. Die Spektren sind methodisch bedingt zeitversetzt.

Auch bei dieser Untersuchung zeigen die Sporangien- und Zoosporenfraktionen die beschriebenen nicht auswertbaren, unbekannten Signale. Und auch hier zeigt sich der verminderte Gehalt an 1,2 verbundener Arabinose bei den reifen Sporangien im Vergleich zu den asynchronen Zellen (54% zu 39% relativer Anteil am Gesamthydrolysat der Fraktion). Erstaunlich ist ebenfalls, dass bei der Untersuchung der entsprechenden Zoosporen-Fraktion 3 kein Signal von 1,2 verbundener Arabinose auszumachen ist (Abbildung 83, unten). Gleichzeitig steigt sowohl bei der Sporangienpräparation, als auch in der entsprechenden Zoosporen-Fraktion der relative Anteil an terminalen Monomereinheiten.

Daneben ergeben die Methylierungsanalysen der Zoosporenfraktionen 5 bis 9, die massenspektrometrisch alle die gestaffelten Ionenspuren zeigen, nur GC-Signale mit unbekannten EI-Fragmentierungsmustern. Bei den Sporangienfraktionen 5 bis 7, die ebenfalls massenspektrometrisch die Signalstaffelungen aufweisen, zeigen sich bei der Methylierungsanalyse aber GC-Signale, aus deren EI-Fragmentierungen die Derivate der bekannten Monomereinheiten abgeleitet werden können. Dabei lässt sich bei den Methylierungsanalysen der Sporangien-Fractionen 5 und 6 auch wieder der geringe Anteil an 1,2 verbundenen Arabinosemonomeren und der entsprechend hohe Gehalt an terminalen Zuckermonomeren beobachten. Das Gaschromatogramm zur Methylierungsanalyse von Aminex-Fraktion 7 der Sporangienaufarbeitung ist in Abbildung 84 abgebildet und zeigt eine Sporangienfraktion, bei der nur die Derivate von terminaler Arabinose und 1,3 verbundener Galaktofuranose und überhaupt keine kettenständige Arabinose zu beobachten sind.



**Abb. 84:** Gaschromatogramm zur Methylierungsanalyse von Aminex-Fraktion 7 der Sporangienaufarbeitung.

### 2.5.1 Zusammenfassung des Kapitels

Die vergleichenden Analysen von Sporangien- und Zoosporenpräparationen beschreiben einen Umbau der Zellwand während der vegetativen Fortpflanzung von *Chlamydomonas* auf der Ebene der Kohlenhydrateinheiten. Viele der durch Kationenaustauschchromatographie erhaltenen Sporangienfraktionen und alle Zoosporenfraktionen zeigen bei den massenspektrometrischen Messungen (ESI-MS) eine eigenartige Signalstaffelung mit Signalabständen von 176 u. Bei den übrigen Sporangienfraktionen lassen sich zwar alle bekannten Hydroxyprolin gebundenen Glykane feststellen, darüber hinaus enthalten diese Fraktionen aber auch einen auffallend hohen Anteil an unbekannten Verbindungen, die bei ihrer Stoßfragmentierung auf das unbekannte Fragmention bei  $m/z$  176 zurückzuführen sind. Daneben zeigen die Methylierungsanalysen der Sporangien- und Zoosporenfraktionen eine deutliche Abnahme des Anteils an kettenständigen, 1,2 verbundenen Arabinoseeinheiten im Verlauf des Zellzyklus, so dass davon ausgegangen werden kann, dass diese Monomereinheiten an einer Umstrukturierung der HypGlykane maßgeblich beteiligt sind.

### 3 Diskussion

#### 3.1 Präparation Hydroxyprolin gebundener Glykane

Die grundsätzliche Problematik der Reinigung und Anreicherung Hydroxyprolin gebundener Glykane aus Gemischen wird deutlich, wenn man den Aufbau der Verbindungen betrachtet. Kilz identifizierte 1999 aus alkalischen Hydrolysaten der Zellwandproteine von *Chlamydomonas reinhardtii* über 20 verschiedene Hydroxyprolin gebundene Glykane einer Kettenlänge von einem bis hin zu elf Zuckermomeren [50]. Die Verbindungen zeigten dabei eine Größenverteilung von einigen hundert bis hin zu etwa zweitausend Masseinheiten. Verbindungen ähnlicher Größe unterscheiden sich oftmals nur in der Verknüpfung oder durch eine einzige Methylgruppe voneinander. Daraus ergibt sich das Problem der Trennung eines komplexen Gemisches von Substanzen ähnlicher Größe und Struktur und somit auch ähnlicher chemischer und physikalischer Eigenschaften.

Die Trennung Hydroxyprolin gebundener Glykane ist methodisch bislang noch wenig etabliert. Versuche, die ausschließlich säulenchromatographische Trennungen beinhalteten, wie etwa von Miller 1972 durchgeführt, zeigten nur eingeschränkt Erfolge [49]. Camparque entwickelte 1998 eine HPLC-Methode, mit der die Glykosylierungsmuster von HRGPs aus Melone nach alkalischer Hydrolyse anhand ihrer Elutionsprofile verglichen werden konnten. Diese Methode basiert auf einer Anionentauscher-Chromatographie mit anschließender amperometrischer Detektion. Bei seinen Messungen konnte Camparque Hydroxyprolin gebundene Glykane jedoch ausschließlich über ihre Retentionszeiten identifizieren [62]. Einen weiteren Beitrag zur Trennung von Oligosacchariden lieferte Guile et al., der 1996 eine HPLC-Methode zur Trennung derartiger Gemische unter Verwendung von Normalphase-Säulenmaterial beschrieb [63]. Ausgehend von diesen Experimenten entwickelte Kilz den bislang vielversprechendsten Ansatz einer Trennung von Hydroxyprolin gebundenen Glykanen [50,53]. Unter Verwendung einer Aminopropylphase und eines Laufmittelsystems aus Wasser und Acetonitril konnte er mit dieser Methode im Rahmen seiner HPLC-ESI-MS-Experimente über 20 verschiedene Verbindungen identifizieren und über ESI-MS<sup>n</sup>-Analysen Aussagen über die Pentose-Hexose-Zusammensetzung einzelner Hydroxyprolin gebundener Glykane aus *Chlamydomonas reinhardtii* treffen.

Die präparative Ausarbeitung der von Kilz entwickelten Methode zu Beginn der vorliegenden Arbeit war die Grundlage zur vollständigen strukturellen Beschreibung der kürzeren Hydroxyprolin gebundenen Glykane aus *Arabidopsis thaliana* und *Chlamydomonas reinhardtii*. Hierzu wurde die ursprüngliche Methode durch einen größeren Säulentyp und veränderte Laufparameter mehrfach modifiziert (Kapitel 4.1.10). Die HPLC-Trennung der über Kationenaustauschchromatographie vorfraktionierten HypGlykane zeigt dabei, dass sich die Verwendung der Aminopropylphase zur Reinigung der kürzeren HypGlykane sehr gut eignet. Hierbei gelingt sogar die Trennung der durch die alkalische Hydrolyse der Aufarbeitung entstandenen Allo- von den natürlichen Trans-Hydroxyprolin gebundenen Verbindungen. Die aufarbeitungsbedingte Bildung dieser Isoformen wurde von Lamport im Jahre 1971 beschrieben aber bis heute nicht bewiesen [81]. Durch die präparative Anreicherung der Verbindungen war es im Rahmen der vorliegenden Arbeit möglich spezielle NMR-Analysen durchzuführen, die eine Cis-Trans-Isomerie an Hydroxyprolin eindeutig belegen (Kapitel 2.1 und 2.2).

Daneben zeigen die Versuche aber auch die Grenzen der HPLC-Methode vor allem bei der Trennung der größeren Verbindungen. Bei diesen größeren HypGlykanen verliert das Säulenmaterial mit zunehmendem Molekulargewicht der untersuchten Verbindungen an Substanzselektivität. Mit Gesamtlaufzeiten von über zwei Stunden und entsprechend flach angelegten Gradienten ist die HPLC-Trennung an dieser Phase methodisch nahezu ausgereizt. Dieses Phänomen ist ein grundsätzliches Problem der Kohlenhydratanalytik. Es wird durch die Vielzahl gleicher und oft auch gleichartig positionierter Molekülteile der verschiedenen zu trennenden Verbindungen hervorgerufen. Die theoretische Wechselwirkung der Hydroxylgruppen der größeren Hydroxyprolin gebundenen Glykane mit den funktionellen  $\text{NH}_2$ -Gruppen der stationären Aminopropylphase ist für eine saubere Trennung der großen HypGlykane zu schwach selektiv. Allerdings stehen heutzutage nur sehr wenige alternative Phasensysteme für eine gute HPLC-Trennung solcher Verbindungen zur Verfügung. Im Rahmen der durchgeführten Arbeiten wurde eine Optimierung durch die Verwendung einer Cyanophase und einer  $\text{Ca}^{2+}$ -beschichteten-Lewatitphase versucht, um beispielsweise über die Ausbildung von Calcium-Chelatkomplexen eine bessere Trennleistung zu erzielen. Hierbei scheiterten Voruntersuchungen aber bereits an der noch schwächeren Selektivität der getesteten Phasen.

Ein weiteres Problem bei der Analyse Hydroxyprolin gebundener Glykane ist auch die Detektierbarkeit der Substanzen. Hydroxyprolin gebundene Glykane lassen sich aufgrund ihrer Absorptionseigenschaften durch standardmäßig verwendete Spektralphotometer, nicht mit ausreichender Genauigkeit messen. Die Alternative zu den optischen Messverfahren ist der chemische Nachweis von Hydroxyprolin nach Kivirikko aus dem Jahre 1963, der in dieser Arbeit in modifizierter Form verwendet wurde. Diese alte Nachweismethode ist reaktiv sensitiv ( $\mu\text{g/ml}$ -Bereich) hat aber methodisch bedingt den Nachteil, das sie nicht „online“ verwendet werden kann und aufgrund der Vielzahl der zu messenden Fraktionen sehr aufwendig ist [52]. Zukünftig könnte aber eine weitere Detektionsmethode den chemischen Ansatz ersetzen. Die heute noch wenig etablierten und sehr teuren Verdampfungslichtstreuungsdetektoren sind universell, hoch sensitiv und für die Kohlenhydratanalytik möglicherweise gut zu verwenden.

### 3.2 Gemeinsame Strukturelemente Hydroxyprolin gebundener Glykane aus *Arabidopsis thaliana* und *Chlamydomonas reinhardtii*

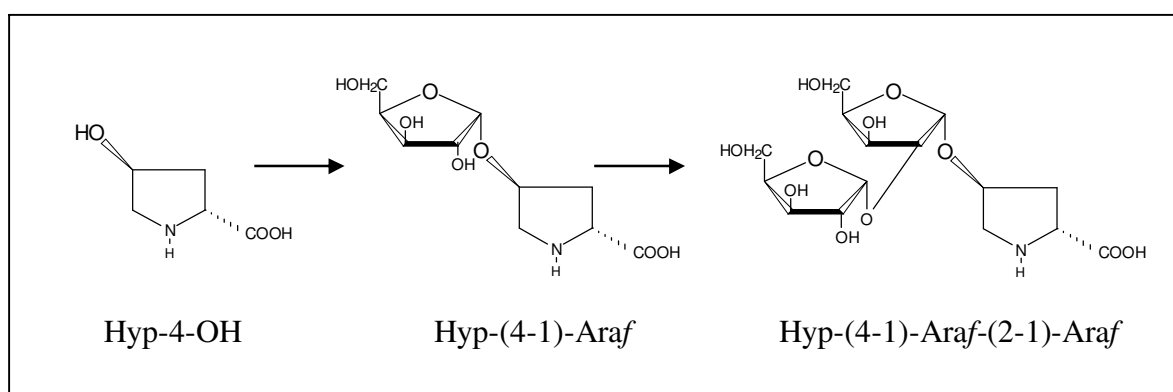


**Abb.85:** *Arabidopsis thaliana*,  
die Ackerschmalwand.

Die Hydroxyprolin gebundenen Glykane HypAra<sub>3</sub> und HypAra<sub>4</sub> der Extensine höherer Pflanzen sind in der Literatur mehrfach untersucht und an Organismen wie Tabak, Tomate, Kartoffel oder Karotte vollständig beschrieben worden [20,21,22,23]. Die Untersuchungen der entsprechenden Verbindungen aus *Arabidopsis thaliana*, die in Kapitel 2.1 dargestellt wurden, liefern hierzu den Beitrag der Komplettanalyse der für höhere Pflanzen charakteristischen aber in *Arabidopsis* noch nie beschriebenen Glykane. Die Analyse von HypAra<sub>3</sub> und HypAra<sub>4</sub> aus *Arabidopsis thaliana* diente in dieser Arbeit somit gleich zwei Zwecken. Zum einen ließen sich die bei den Messungen an *Arabidopsis*

Präparationen erhaltenen Ergebnisse über den Vergleich mit bekannten Literaturwerten verifizieren und dienten somit als Standardwerte [19,20,59]. Gleichzeitig erlaubte die vergleichende Analyse der *Arabidopsis* Glykane mit den entsprechenden Verbindungen der äußeren Zellwand von *Chlamydomonas reinhardtii* den direkten Vergleich der Glykosylierung einer einfachen Grünalge mit den modernen Landpflanzen.

Die Ergebnisse zeigen dabei viele Gemeinsamkeiten in den Glykosylierungsstrategien beider Organismen. So tragen alle Glykane aus *Chlamydomonas* die für höhere Pflanzen beschriebenen ersten beiden an Hydroxyprolin gebundenen Arabinosemonomere. Hierbei entsprechen die Verbindungspositionen der beiden 1,2 verbundenen Zuckermomere ebenso der aus Extensinen bekannten Verknüpfung wie die durch NMR-Analysen ermittelte  $\beta$ -L-Konformation dieser Monomereinheiten. Aufgrund der vollständigen strukturellen Übereinstimmung dieser Strukturelemente kann dabei auf ein gemeinsames evolutives Prinzip der ersten Reaktionsschritte in der O-Glykosylierung von Hydroxyprolin zurückgeschlossen werden.



**Abb.86:** Gemeinsame Reaktionsschritte bei der O-Glykosylierung von Hydroxyprolin von *Chlamydomonas reinhardtii* und *Arabidopsis thaliana*.

### 3.3 Galaktofuranosen der Hydroxyprolin gebundenen Glykane aus *Chlamydomonas reinhardtii*

Neben den vielen Gemeinsamkeiten zeigen die Präparationen der *Chlamydomonas reinhardtii* Glykane aber auch viele Unterschiede zu höheren Pflanzen. Während die Glykane der Extensine ausschließlich Arabinosemonomere tragen, setzen sich die komplexeren Verbindungen aus *Chlamydomonas reinhardtii* auch aus Galaktose- und Glukoseeinheiten zusammen [49]. Dabei tragen, mit Ausnahme der kleinsten zuvor dargestellten Verbindungen, alle *Chlamydomonas* Glykane an der dritten Kettenposition eine Galaktoseeinheit, die zum Teil an ihrer C<sub>6</sub>-Position methyliert ist. Die Besonderheit dieser Galaktosemonomere liegt in ihrer Ringkonfiguration. Die Methylierungsanalysen der Kapitel 2.2 und 2.3 zeigen, dass der größere Anteil dieser Galaktoseeinheiten in der außergewöhnlichen Konfiguration einer Hexofuranose vorliegt. Das Bemerkenswerte an diesem Befund ist, dass Hexofuranosen zwar von Roberts im Jahre 1980 in *Chlamydomonas reinhardtii* gefunden wurden, daneben aber im

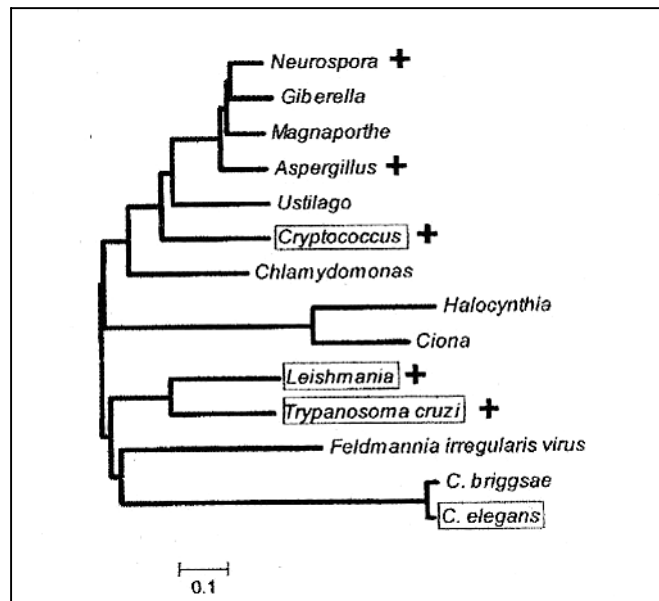


Pflanzenreich bislang sonst überhaupt nicht beschrieben sind [64]. Den Ergebnissen von Roberts wurde offenbar keine große Bedeutung beigemessen, jedenfalls wurde der Befund damals nicht weiter verfolgt.

Das Wissen über die Glykosylierung verschiedenster Organismen hat sich seitdem erweitert. Eine weite Verbreitung finden Galaktofuranosemonomere in den Glykolipiden, Proteoglykanen, Zellwandpolysacchariden und Exopolysacchariden von Pilzen und Hefen [65,66,67,68]. Daneben finden sich Galaktofuranosen auch in Makromolekülen von Bakterien und Protozoen [69,70,71]. Die genaue Funktion der Galaktofuranoseeinheiten in den verschiedenen Organismen ist bislang nur zum Teil verstanden. Der Einfluß Galf tragender Makromoleküle bei Zell-Zell-Erkennungsmechanismen und dem parasitären Befall wird zurzeit untersucht [66,72]. Hierbei wird die Rolle der speziellen Galf-Einheiten als spezielles Proteinbindemotiv unter anderen bei Zell-Zell-Erkennungsmechanismen diskutiert [66,72].

Einer dieser Organismen, der die für Pflanzen unbekannten Galaktofuranosen trägt, ist der einzellige Parasit *Trypanosoma cruzi*, der für die Chagas-Krankheit verantwortlich ist. An dieser Krankheit leiden heute etwa 18-20 Millionen Menschen in Süd- und Mittelamerika [73]. Man geht davon aus, dass die Galaktofuranoseeinheiten der Glykocalyx maßgeblich an den pathogenen Eigenschaften dieses Organismus beteiligt sind [68].

Über die Biosynthese der Glykokonjugate von *T. cruzi* ist wenig bekannt, jedoch konnte eine Galaktofuranosylaktivität nachgewiesen werden, die UDP-Galf als Donor verwendet, ebenso wie für die Synthese der *Chlamydomonas reinhardtii* Glykane angenommen [74]. Daneben besitzt der pathogene Organismus *T. cruzi* eine spezielle UDP-Galaktopyranosemutase (EC 5.4.99.9), die die Bildung der Galaktofuranosen aus Galaktopyranosen katalysiert. Genomische Sequenzvergleiche dieser Enzyme, die von Beverly et al. im Jahre 2005 durchgeführt wurden, zeigen, dass neben Pilzen wie beispielsweise *Aspergillus nidulans* oder *Cryptococcus neoformans* und den einzelligen Flagellaten wie *Leishmania major* und *Trypanosoma cruzi* auch die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* über eine entsprechende Galaktopyranosemutase verfügt. Diese Studien zeigen auch, dass die sequentielle Übereinstimmung dieses Gens zwischen *Chlamydomonas* und den Pilzen wesentlich höher ist als zwischen der Alge und den einzelligen Flagellaten (Abbildung 87) [75].



**Abb. 87:** Phylogenetischer Baum der eukaryotischen Galaktopyranosemutase-Familie nach Beverly [74].

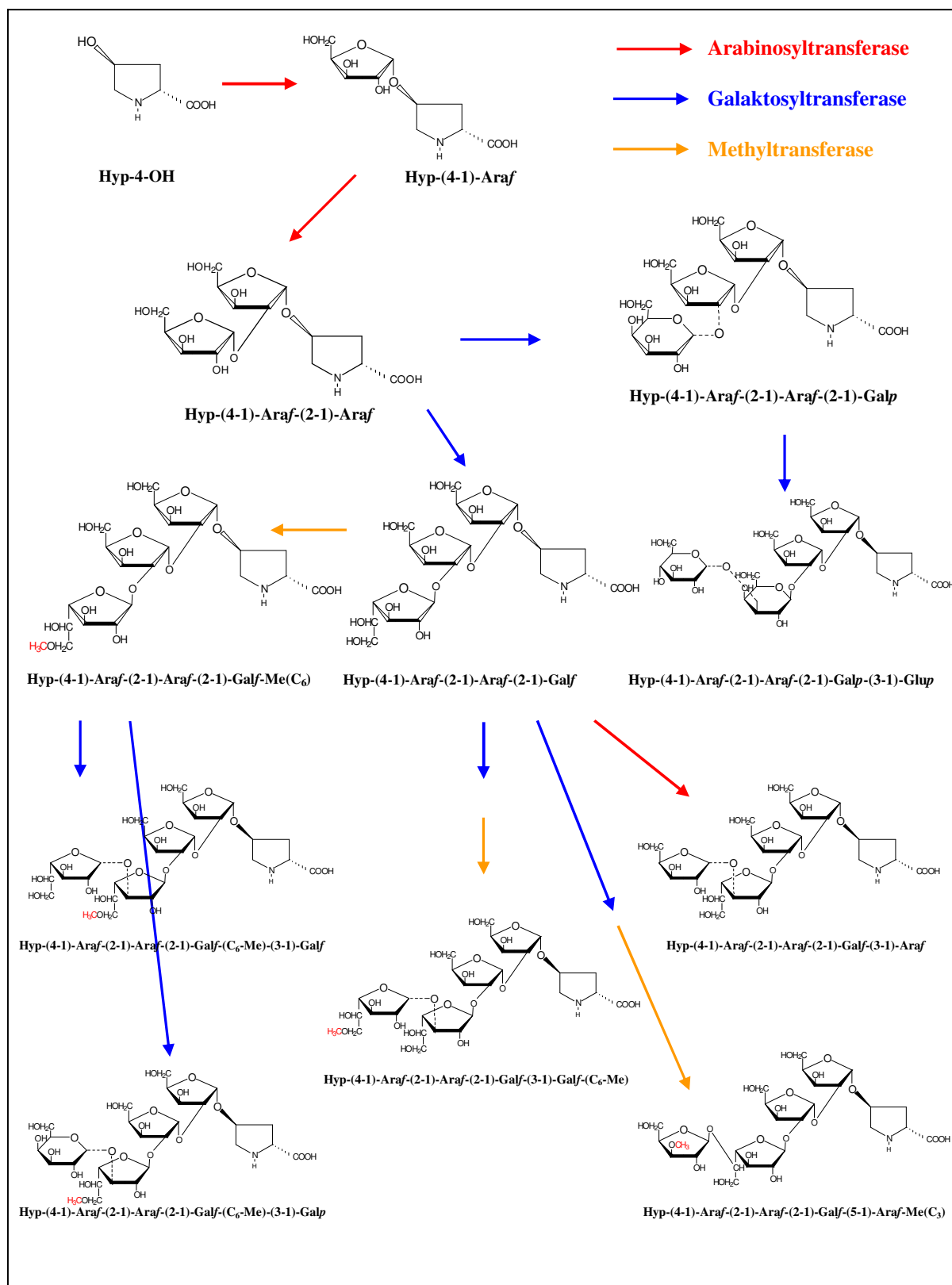
Mit einem Plus-Zeichen hat der Autor die Organismen versehen, bei denen bis zum heutigen Zeitpunkt das Vorkommen von Galaktofuranose nachgewiesen wurde. Dabei fehlt bei *Chlamydomonas* eine entsprechende Markierung, ein Beleg dafür, dass die ältere Studie von Roberts hierbei unberücksichtigt geblieben ist [64]. Daneben unterstreichen die in Kapitel 2.4 bei der Untersuchung der HypGlykane aus *Chlamydomonas Incerta* gewonnenen Ergebnisse, dass es sich bei der Galaktofuranose um ein charakteristisches Element der ganzen Gattung *Chlamydomonas* handelt. Im eigenen Arbeitskreis werden zurzeit Studien an Zellwandpräparationen von *Volvox carteri* und *Gonium* durchgeführt, um zu untersuchen, ob der Einbau der Galaktofuranosemonomere nicht sogar ein Charakteristikum der ganzen Familie der *Volvocales* darstellt.

Die genauere Untersuchung der am Aufbau und Umbau der *Chlamydomonas*-Wand beteiligten Enzyme könnte im Hinblick auf pathogene Organismen von besonderem Interesse sein, da hier für *T. cruzi* und auch bei Pilzbefall von Nutzpflanzen Angriffspunkte für mögliche Behandlungskonzepte zu sehen sind [68]. Die Zellwände von Kartoffel- oder Tabakzellen verfügen weder über Hexofuranosen noch über die entsprechenden Enzyme aus dem Zellstoffwechsel [75].

### 3.4 Biosynthese linearer Hydroxyprolin gebundener Glykane aus *Arabidopsis thaliana* und *Chlamydomonas reinhardtii*.

Die Glykosylierung der Zellwandproteine erfolgt im Golgi-Apparat einer Pflanzenzelle. Die gängige Lehrmeinung dabei ist, dass bei der O-Glykosylierung Nucleotid-aktivierte Zucker über spezifische Glykosyltransferasen Schritt für Schritt auf eine wachsende Glykankette übertragen werden [76]. Daneben wird aber auch vermutet, dass bestimmte verzweigte Zuckerseitenketten von Arabinogalaktanproteinen ähnlich der N-Glykosylierung blockweise übertragen werden [54]. Einen stichhaltigen Beweis gibt es für keine der beiden Theorien. Über die an der O-Glykosylierung beteiligten Transferasen ist nur sehr wenig bekannt. Arabinosyltransferaseaktivitäten konnten bei höheren Pflanzen in Präparationen des Golgi-Apparates nachgewiesen werden [77,78,79]. Auch in *Chlamydomonas* wurde eine entsprechende Arabinosyltransferaseaktivität und weitere Glykosyltransferaseaktivitäten gefunden, jedoch wird bislang noch diskutiert, ob diese Transferasen im ER oder im Golgi-Apparat der Algenzelle lokalisiert sind [76]. Messungen, die von Drees im Rahmen ihrer Dissertation an *Chlamydomonas* Präparationen durchgeführt wurden, zeigen die Aktivitäten verschiedener Glykosyltransferasen nach Zellfraktionierung ausschließlich in den Golgi-Fractionen [80].

Obwohl über die Vielzahl und Spezifität der am Aufbau Hydroxyprolin gebundener Glykane beteiligten Enzyme wenig bekannt ist, erlaubt die genaue strukturelle Beschreibung der Glykane, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, selber einen Rückschluss auf die Biosynthese der Verbindungen. Dabei werden die in den Kapiteln 2.2 und 2.3 beschriebenen Hydroxyprolin gebundenen Glykane bis zu einer Größe von vier Zuckermomeren zugrunde gelegt. Bei dem nachfolgend dargestellten Biosyntheschema wird außerdem von dem klassischen Modell einer sukzessiven Übertragung einzelner Zuckermomere bei der O-Glykosylierung ausgegangen [76]. Die ersten beiden Schritte der Biosynthese sind in Abbildung 88 hervorgehoben, da diese Schritte, wie zuvor dargestellt, aufgrund der vollständigen strukturellen Übereinstimmung der 1,2 verbundenen Arabinoseeinheiten der *Chlamydomonas*- und der *Arabidopsis*-Glykane auch für die Extensine höherer Pflanzen gelten müssen (Kapitel 3.2).



**Abb. 88:** Biosynthese Hydroxyprolin gebundener Glykane aus *Chlamydomonas reinhardtii* bis zu einer Kettenlänge von vier Zuckermomeren. Die grau markierten Schritte entsprechen der Biosynthese von HypAra<sub>3</sub> und HypAra<sub>4</sub> aus Extensinen höherer Pflanzen.

### 3.5 Größere Hydroxyprolin gebundene Glykane aus *Chlamydomonas*

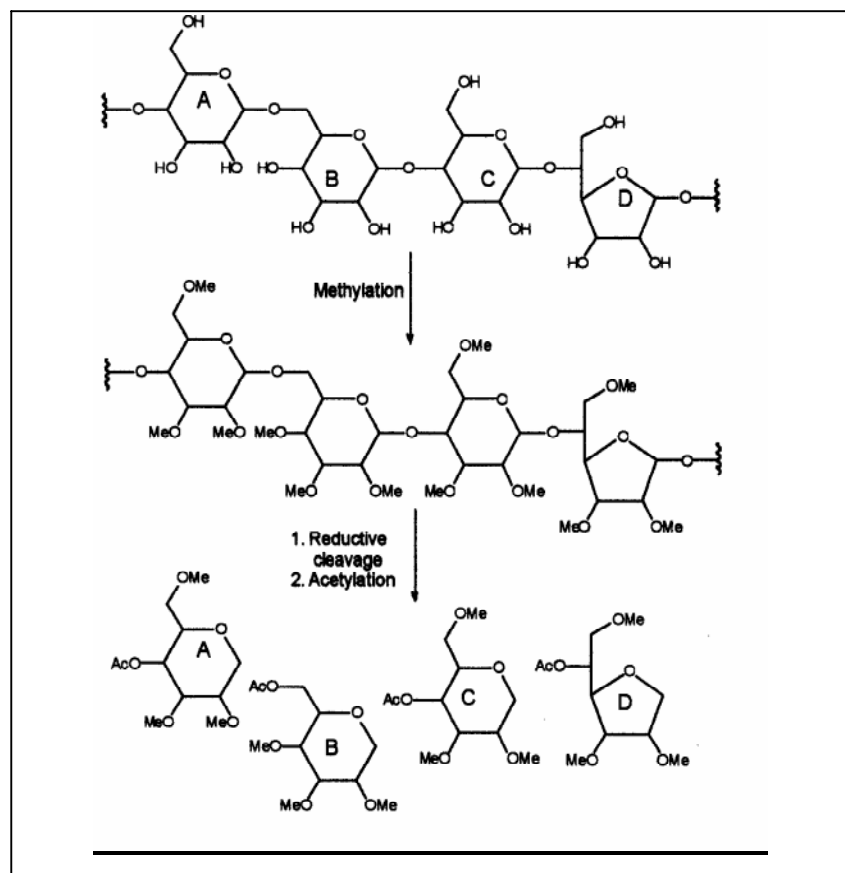
Die größeren Hydroxyprolin gebundenen Glykane aus *Chlamydomonas* entstehen durch die Kettenverlängerung der zuvor dargestellten Verbindungen um weitere Pentose- und Hexoseeinheiten, die zum Teil einfach methyliert sind. Die Verbindungen mit einer Kettenlänge von mehr als vier Zuckermomeren wurden durch Methylierungsanalysen bezüglich der Verknüpfungspositionen ihrer einzelnen Monomerbestandteile beschrieben. Dabei ist auffällig, dass von allen Hexosebestandteilen nur Monomere in der außergewöhnlichen Furanosekonfiguration anteilig an ihrer C<sub>6</sub>-Position methyliert sind, so dass sich hier die Spezifität der daran beteiligten Methyltransferase vermuten lässt. Auch Arabinosemonomere werden methyliert, wobei die Methylgruppen ausschließlich an Kohlenstoffposition C<sub>3</sub> des Zuckerrückgrades lokalisiert sind.

Neben den einfach kettenverlängerten Monomereinheiten, die zum Teil methyliert vorliegen, tragen die größeren Hydroxyprolin gebundenen Glykane anteilig auch verzweigte Monomereinheiten. Dabei handelt es sich um 1,2,5 verbundene oder vollständig querverzweigte Arabinosemonomere. Daneben lassen sich auch einige kettenverlängerte und verzweigte Hexoseeinheiten bestimmen, wobei hier gezeigt werden kann, dass sowohl die Hexofuranosen als auch die Hexopyranosen kettenverlängert und verzweigt werden (Kapitel 2.3).

Bei jeweils einer der kettenverlängerten und einer der verzweigten Hexoseeinheiten der *Chlamydomonas* Präparation war zuvor bei der Methylierungsanalyse die Frage offen geblieben, welche genauen Verknüpfungspositionen und Ringkonfigurationen diese Zuckermomere besitzen (Seite 78). Bei der Methylierungsanalyse dieser Monomere lassen sich Fragment-Ionen von Derivaten beobachten, die nach entsprechender Aufarbeitung sowohl an Kohlenstoffposition C<sub>4</sub> als auch an Position C<sub>5</sub> durch Acetylierung markiert sind. Bei diesen Hexosemonomeren kann über Methylierungsanalyse nicht mehr zwischen der nativen Position des Ringschlusses und der Verknüpfungsposition an der Position C<sub>4</sub> und C<sub>5</sub> des Zuckerrückgrades unterschieden werden. Die anomere Konformation dieser Hexosen lässt sich schließlich durch die magnetische Kernresonanzspektrometrie bestimmen. Dabei zeigen sich die charakteristischen Werte von  $\alpha$ -konfigurierten Hexofuranoseeinheiten.

Eine weitere Untersuchung dieser beiden Monomere wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Es wäre allerdings zukünftig auch denkbar, durch eine Verbesserung der

Reinigungsprozedur auch die größeren Hydroxyprolin gebundene Glykane anzureichern. Diese könnten danach durch den reduktiven Abbau nach Gray und anschließender Methylierungsanalyse weiter untersucht werden [82,83] (Abbildung 89).



**Abb. 89:** Methylierungsanalyse nach der Reductive-Cleavage Methode von Gray 1987 [82]. Im Falle der Monomere C und D bleibt im Gegensatz zur Standardmethode die Information über die Ringkonfiguration der Monomere erhalten.

Die Gesamtbetrachtung aller durch die Methylierungsanalyse ermittelter Monomerbestandteile der HypGlykane der perchloratlöslichen *Chlamydomonas*-Zellwand erlaubt den direkten Vergleich zu anderen Proteinfamilien der Superfamilie der HRGPs.

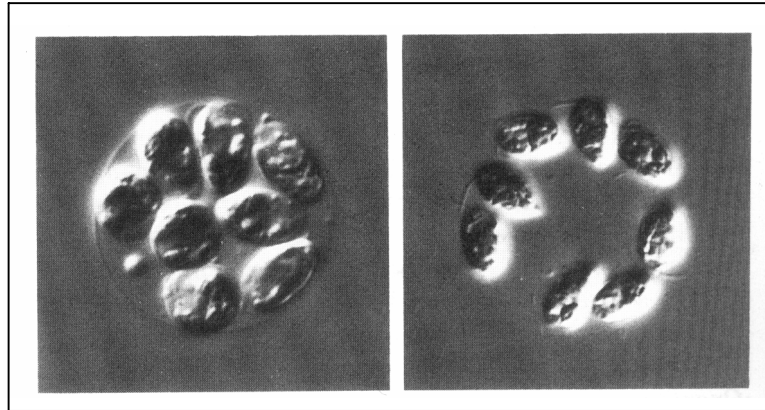
Besonders auffällig ist der Vergleich zur Familie der Arabinogalaktanproteine. Hierbei handelt es sich wie in der Einleitung vorgestellt um hochglykosylierte Proteine mit einem Kohlenhydratanteil von zum Teil über 90 %, die vor allem durch die enorme industrielle Bedeutung der zur Kautschukherstellung verwendeten Gummi-Arabikum-Proteine bekannt geworden sind. Arabinogalaktanproteine setzen sich ausschließlich aus Arabinose- und Galaktoseeinheiten zusammen und besitzen einen außerordentlich hohen Anteil an verzweigten Monomereinheiten. Die charakteristischen Verzweigungspositionen der Arabino-

galaktanproteine sind 1,2 verbundene Arabinoseeinheiten, die an verschiedenen Positionen verzweigt sind und 1,3 verbundene Galaktopyranoseeinheiten mit der charakteristischen Verzweigungsposition an C<sub>6</sub> [11]. Dabei lassen sich die zum Kettenaufbau verwendeten Verknüpfungspositionen der Arabinogalaktanproteine, die 1,2 verbundenen Pentoseeinheiten und die 1,3 verbundenen Hexoseeinheiten, auch bei den HypGlykanen von *Chlamydomonas* wiederfinden. Verzweigte Zucker besitzt *Chlamydomonas reinhardtii* zwar auch, jedoch treten im Falle der Arabinosemonomere „einfache“ Verzweigungen überwiegend an Kohlenstoffposition C<sub>5</sub> des Zuckerrückgrades auf. An Position C<sub>3</sub> verzweigte Arabinoseeinheiten lassen sich bei den *Chlamydomonas*-Glykanen nicht finden. Bezüglich der Galaktoseeinheiten der *Chlamydomonas* Glykane lassen sich ebenfalls keine an C<sub>6</sub> verzweigten Elemente feststellen, denn selbst bei den über Methylierungsanalysen nicht eindeutig bestimmbaren Monomereinheiten lässt sich diese Verzweigungsposition aufgrund der EI-Fragmentierungen bei der GC-MS-Analyse grundsätzlich ausschließen.

Bemerkenswert im Vergleich der beiden Proteinfamilien ist aber nicht nur das „Ausbleiben“ der entsprechenden Verzweigungspositionen der HypGlykane von *Chlamydomonas*. Auffällig ist auch, dass es sich hierbei um die Verknüpfungspositionen handelt, die bei den *Chlamydomonas* Glykanen durch Methylierung modifiziert vorliegen. So lassen sich bei der Analyse der *Chlamydomonas* Glykane ausschließlich C<sub>3</sub>-methylierte Pentoseeinheiten und C<sub>6</sub>-methylierte Hexoseeinheiten ermitteln. Eine auffällige Übereinstimmung, denn das Auftreten nur ganz bestimmter Methylierungsstellen und das gleichzeitige Ausbleiben von entsprechenden Verzweigungspositionen grenzt nicht nur einerseits die beiden Proteinfamilien der *Chlamydomonas*-HRGPs und der Arabinogalaktanproteine strukturell voneinander ab, sondern könnte auch auf einen möglichen funktionellen Unterschied der beiden Protein-familien hindeuten. Den Arabinogalaktanproteinen wird, vor allem aufgrund ihres hohen Anteils an langkettigen, verzweigten Zuckerseitenketten, eine entscheidende Rolle bei der Wasserbindung und der Organisation anderer Zellwandbestandteile zugeschrieben [93], während für die *Chlamydomonas*-HRGPs zahlreiche Funktionen unter anderem bei der Fortpflanzung der Grünalge beschrieben sind [31,40,84].

### 3.6 Glykosylierungsunterschiede im Zellzyklus

Im Verlauf der vegetativen Fortpflanzung muss die Zellwand von *Chlamydomonas* von bestimmten Proteasen angegriffen werden, die hochspezifisch zwischen den Zellwänden der verschiedenen Wachstumsstadien unterscheiden können (Abbildung 90, Kapitel 1.4).



**Abb. 90:** Lyse der Sporangienzellwand bei der vegetativen Fortpflanzung von *Chlamydomonas* [33].

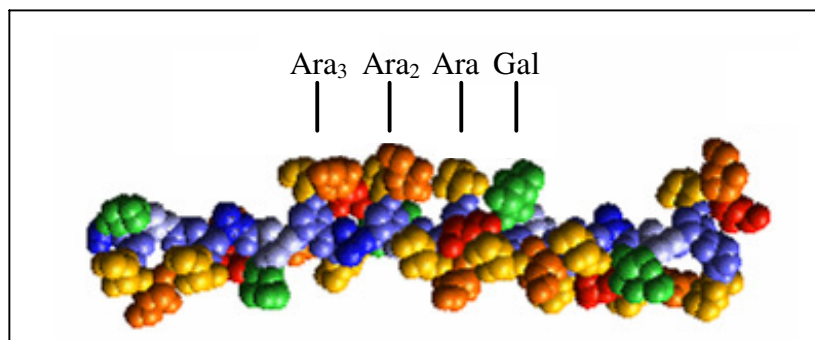
Der Angriffspunkt dieser Proteasen ist noch nicht geklärt, jedoch zeigen frühere Studien von Waffenschmidt, dass sich die Zusammensetzung von Sporangien- und Zoosporenzellwänden aus *Chlamydomonas* bezüglich ihrer Aminosäurezusammensetzung nicht unterscheiden [60]. Somit kann davon ausgegangen werden, dass der Proteinanteil der Zellwand im Wachstumsverlauf nicht wesentlich verändert. Daneben konnte Waffenschmidt aber einen unterschiedlichen Gehalt an Arabinose und Galaktose zu den verschiedenen Wachstumszeitpunkten beobachten.

Durch die Methylierungsanalysen aus Kapitel 2.5 konnte gezeigt werden, dass reife Sporangienzellen und Zoosporenzellen einen deutlich verminderten Anteil an 1,2 verbundenen Arabinosemonomeren gegenüber von Zellen in einem asynchronen Zellstadium aufweisen.

Auffällig ist gleichermaßen die massenspektrometrische Analyse der HypGlykane der beiden Zellstadien. So zeigen die ESI-MS-Messungen der ersten vier Sporangienfraktionen zwar die Signale der bekannten Hydroxyprolin gebundenen Glykane, daneben besitzen diese Fraktionen aber auch einen bemerkenswert hohen Anteil an Verbindungen, die bei ihrer Kollisionsaktivierung auf ein Fragmentation bei  $m/z$  176 zurückführen. Gleichzeitig zeigt die massenspektrometrische Analyse einiger Sporangienfraktionen und aller Zoosporenfraktionen eine auffällige Signalstaffelung von Molekularionen, wobei sich auch hier ein signifikanter Abstand fast aller Signale von 176 Masseeinheiten erkennen lässt.



Die genaue Struktur der neuartigen Hydroxyprolin gebundenen Glykane von Sporangien- und Zoosporen-Zellwänden konnte mit der in dieser Arbeit verwendeten Methodik nicht aufgeklärt werden. Die Methylierungsanalysen einiger Fraktionen der genannten Zellstadien zeigen zwar gaschromatographisch neuartige Signale, es ist jedoch unmöglich aus den dazugehörigen EI-Fragmentierungen nach alkalischer und saurer Hydrolyse, Perdeuteromethylierung, Deuteroreduktion und Acetylierung eine unbekannte native Struktur abzuleiten. Dies liegt vor allem daran, dass die verschiedenen Möglichkeiten zur Umstrukturierung einer Zellwand sehr zahlreich sind. So könnten die beteiligten Zuckermonomere durch „Anheften“ unbekannter Gruppen modifiziert werden, es könnte sich aber genauso gut um den Effekt einer intramolekularen Vernetzung der Zuckermonomere handeln, bei der auch denkbar wäre, dass die an Serin gebundenen einzelnen Galaktoseeinheiten eine Rolle spielen. Eine solche Theorie ist jedoch spekulativ und lediglich dadurch zu begründen, dass die räumlichen Distanzen benachbarter Arabinoseeinheiten in den verschiedenen glykosylierten Bereichen einer Polyprolin-II-Helix einen derartigen Mechanismus nicht grundsätzlich ausschließen (Abbildung 91).



**Abb.91:** Raum-Modell einer pp-II-Helix mit verschiedenen glykosylierten Bereichen.  
(modelliert von Gerd Wohlfahrt)

### 3.7 Ausblick

Die Bedeutung der Galaktofuranosemonomere in Hydroxyprolin gebundenen Glykanen von *Chlamydomonas* wurde zuvor erläutert. Auf der Ebene der Kohlenhydrateinheiten wäre es grundsätzlich denkbar, die leicht zu reinigenden HypGlykane der Grünalge zur Synthese von monoklonalen Antikörpern zu verwenden, die im Vergleich verschiedener Organismen untereinander und auch in der Diagnostik von pathogenen Erkrankungen von besonderem Nutzen sein könnten. Gleichzeitig bieten auch die am Einbau und an der Synthese der Galaktofuranosen beteiligten Enzyme zahlreiche Ansatzpunkte weiterer Forschung. So könnte die Untersuchung dieser Enzyme im Hinblick auf eine mögliche Inhibition der Synthese oder der Interaktion pathogener Oberflächenstrukturen von grundlegender Bedeutung sein. Dazu müssten die Enzyme aus *Chlamydomonas* aber zunächst isoliert und biochemisch charakterisiert werden. Daneben ermöglicht das vor kurzem abgeschlossene *Chlamydomonas*-Genom-Projekt den sequentiellen Vergleich dieser Enzyme mit anderen Organismen [85].

Ein weiterer wichtiger Teilaspekt dieser Arbeit ist der Umbau der Zellwand während der vegetativen Fortpflanzung von *Chlamydomonas*. Hier wäre es sicher anzustreben, die neuartigen Glykanstrukturen, die bei der massenspektrometrischen Analyse auf das unbekannte Fragmention bei  $m/z$  176 zurückführen, strukturell weiter zu untersuchen. Denkbar wäre die Anreicherung der unbekannten Glykane in Sporangien-Kulturen, da diese einen deutlich erhöhten Anteil dieser Verbindungen gegenüber einer asynchronen Zell-Kultur aufweisen. Anschließend könnten dann NMR-Studien zur kompletten Strukturaufklärung der Verbindungen beitragen und so möglicherweise grundlegende Fragen über die Umbildung der Zellwand im Wachstumsverlauf beantworten.

Der dritte und letzte Punkt dieses Ausblickes widmet sich der vieldiskutierten und bislang wenig verstandenen Frage nach dem Code der O-Glykosylierung der Hydroxyprolinreichen Glykoproteine. Bei den charakteristischen Glykosylierungsmotiven der HRGPs handelt es sich wie in der Einleitung dargestellt um bestimmte repetitive Aminosäuremotive. So findet die Glykosylierung der Extensine höherer Pflanzen ausschließlich an den beiden hochrepetitiven Aminosäurefolgen SP<sub>3</sub> und SP<sub>4</sub> statt [13]. Andere Organismen wie die einzellige Grünalge *Chlamydomonas* tragen zwar auch die Sequenzmotive höherer Pflanzen, besitzen daneben aber auch zahlreiche weitere Sequenzfolgen, beispielsweise PPSPX-Motive oder alternierende SP-Einheiten [47]. Kieliszewski und Lamport konnten 1994 zeigen, dass die

Hydroxyprolinreste verschiedener HRGPs mit unterschiedlichen Zucker-Seitenketten versehen sind [86]. Daher wird angenommen, dass der Glykosylierung an den verschiedenen repetitiven Aminosäuremotiven ein ganz bestimmtes Muster, ein Glykosylierungscode zuzuordnen ist. Kieliszewski entwickelte die Hyp-Contiguity-Theorie, die davon ausgeht, dass eine kontinuierliche Folge von Hydroxyprolinresten mit kurzen Arabinosezuckerketten versehen wird, während andere Hyp-Motive, die durch weitere Aminosäuren unterbrochen sind, galaktosyliert vorliegen. Untersucht wurde diese Hypothese mit synthetischen Glykogenen, die bei Expression in Pflanzenzellen, Oligopeptide mit verschiedenen Prolin-Motiven hervorbringen [87,88,89,90]. Die Untersuchung der Glykosylierung dieser Peptide unterstützt aber nur in einigen Fällen diese Theorie.

Auch in *Chlamydomonas* ist der Code der O-Glykosylierung bislang unbekannt, dabei liefert der Organismus nahezu ideale Grundvoraussetzungen zur Untersuchung dieser Fragestellung. Die Zellwandproteine der Grünalge sind leicht zu reinigen und tragen neben den repetitiven Aminosäuremotiven der Extensine eine Reihe weiterer, unterschiedlicher Sequenzmotive [47]. Die Qualität und Quantität dieser repetitiven Elemente sind zudem in den drei Glykoproteinen der vegetativen *Chlamydomonas*-Wand sehr unterschiedlich. Ein interessanter Ansatz wäre durch einen enzymatischen, beispielsweise tryptischen Verdau der gereinigten Glykoproteine kleinere Peptide zu erzeugen, die sich aufgrund verschiedener Hydroxyprolinmotive voneinander unterscheiden. Diese Peptide könnten dann über Edman-Abbau identifiziert und mit der in dieser Arbeit vorgestellten Analytik bezüglich ihrer Glykosylierung untersucht werden.

## 4 Methodischer Teil

### 4.1 Reinigung von HypGlykanen aus *Chlamydomonas reinhardtii*

Im Gegensatz zu den Extensinen aus *Arabidopsis* sind die Glykoproteine GP1, GP2 und GP3 der äußeren Zellwand von *Chlamydomonas* nicht kovalent in der Zellwand verankert, sondern lediglich durch sekundäre Wechselwirkungen in das Grundgerüst der inneren Zellwand eingebettet (Kapitel 1.5). Durch die Behandlung der sedimentierten Algenzellen mit Chaotropen wie Natriumperchlorat können diese sekundären Wechselwirkungen so stark beeinträchtigt werden, dass sich die Proteine von dem Rest der Zelle trennen lassen und so den Rohextrakt, die so genannte Perchlorat lösliche Wand (perchlorate soluble wall; PSW) bilden [42]. Die Methode hat dabei den enormen Vorteil, dass sich die Glykoproteine sehr einfach von weiteren Zellbestandteilen, insbesondere auch von den Pigmentfarbstoffen des Chloroplasten trennen lassen. Darüber hinaus konnte Goodenough 1986 zeigen, dass die Entfernung des chaotropen Salzes durch Dialyse zur Ausbildung von Glykoproteinkomplexen führt, die sich durch Zentrifugation gewinnen lassen [45]. Durch erneutes Lösen der Komplexe im Chaotrop und anschließender Wiederholung der Dialyse, lassen sich die Proteine weiter anreichern und bilden je nach Häufigkeit des Vorganges verschiedene Reinheitsstufen der Perchlorat löslichen Wand. Ein wesentlicher Nachteil der Erzeugung von Reinheitsstufen besteht allerdings darin, dass die Proteine zur Ausbildung der Glykoproteinkomplexe den Schwellenwert einer Konzentration von etwa 3mg/ml erreichen müssen. Dadurch liegt der Verlust der Glykoproteine mit Werten von zum Teil über 60 Prozent an Proteinmasse pro Reinheitsstufe äußerst hoch. Die dargestellten Untersuchungen wurden daher überwiegend an aus dem Rohextrakt erhaltenen HypGlykanen durchgeführt. Zu einigen Kontrollexperimenten wurden aber auch die jeweils zweiten Reinigungsstufen einer Zellwandpräparation verwendet. Zur Gewinnung der HypGlykane wurden die angereicherten Proteine in einer Bariumhydroxidlösung alkalisch hydrolysiert und mit Schwefelsäure neutralisiert. Diese Vorgehensweise hat den Vorteil, dass sich dabei ausfallendes Bariumsulfat leicht durch Zentrifugation entfernen lässt. Die Reinigung und Trennung der Hydroxyprolin gebundenen Glykane erfolgte anschließend chromatographisch über Kationenaustauschchromatographie, Gelfiltration und HPLC. Die genauen Arbeitsschritte der Präparation Hydroxyprolin gebundener Glykane sind nachstehend schematisch dargestellt und in den folgenden Kapiteln erläutert.

**Tabelle 11:** Schema der Präparation Hydroxyprolin gebundener Glykane.

Arbeitsablauf	Kapitel
<b>200 l Zellkultur (<math>\sim 2 \cdot 10^6</math> Zellen <math>\cdot</math> ml<sup>-1</sup>)</b>	4.1.1 - 4.1.4
<b><u>PSW-Rohextrakt</u></b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Abzentrifugieren der gewaschenen Algen</li> <li>- Inkubation in 1 M NaClO<sub>4</sub></li> <li>- Zentrifugation und Verwerfen des Sedimentes</li> <li>- Dialyse des Überstandes gegen H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub></li> <li>- Gefriertrocknen des Überstandes</li> </ul>	4.1.5
<b><u>1. Reinigungsstufe</u></b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lösen in 1 M NaClO<sub>4</sub></li> <li>- Zentrifugation und Verwerfen des Sedimentes</li> <li>- Dialyse des Überstands gegen 10 mM EDTA</li> <li>- Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes</li> </ul>	4.1.6
<b><u>2. Reinigungsstufe</u></b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sediment in 1 M NaClO<sub>4</sub> resuspendieren</li> <li>- Zentrifugation und Verwerfen des Sedimentes</li> <li>- Dialyse des Überstandes gegen 10 mM EDTA</li> <li>- Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes</li> </ul>	4.1.6
<b><u>Präparation Hydroxyprolin gebundener Glykane</u></b>	
Alkalische Hydrolyse der PSW bzw. der 2. Reinigungsstufe mit 0,44 N Ba(OH) <sub>2</sub> -Lösung 20 h unter Rückfluß kochen	4.1.8
↓	
Neutralisation des Hydrolysates mit 2 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Entfernen des BaSO <sub>4</sub> -Niederschlags durch Zentrifugation; Lyophilisation des Überstandes	4.1.8
↓	
Resuspension des Lyophilisates in HCl	4.1.9
↓	
Kationenaustauschchromatographie zur Trennung der Hydroxyprolinglykoside Gradient: 0,1 - 0,5 N HCl	4.1.9
↓	
Bestimmung des Hydroxyprolingehaltes aller Fraktionen	4.2.2
↓	
Vereinigung relevanter Fraktionen; Neutralisation mit NaOH; Lyophilisation	4.1.9
↓	
Resuspension des Lyophilisates in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	4.1.9
↓	
Gelchromatographie zur Entsalzung der Fraktionen	4.1.9
↓	
Bestimmung des Hydroxyprolingehaltes aller Fraktionen; Vereinigung hydroxyprolinhaltiger Fraktionen; Lyophilisation	4.2.2
↓	
Trennung von Hydroxyprolinglykosiden mittels HPLC	4.1.10

#### 4.1.1 Algenstämme und Kulturbedingungen

Bei der für die beschriebenen Arbeiten verwendeten einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*, handelte es sich mit Ausnahme der Kapitel 2.4 und 2.5 um den flagellenlosen Stamm **mt<sup>-</sup>cc479bald-2** (GOODENOUGH und ST. CLAIR, 1975) aus der Sammlung des *Chlamydomonas* Genetics Center (Department of Botany, Duke University, Durham NC, USA). Die Verwendung dieses speziellen Algenstammes stellt sicher, dass es sich bei den untersuchten Glykoproteinen tatsächlich um die Proteine der äußeren Zellwand von *Chlamydomonas* handelt. Darüber hinaus hat dieser Algenstamm den enormen Vorteil, dass die Algenzellen von selber sedimentieren und sich dadurch ein Großteil des verwendeten Kulturmediums ohne zeitaufwendige Zentrifugation abdekantieren lässt. In Kapitel 2.4 wurden vergleichende Analysen an einer weiteren *Chlamydomonas* Art, an *Chlamydomonas incerta* durchgeführt hierbei handelt es sich um den Stamm CC-3871. Die Untersuchungen der Glykosylierungsunterschiede im Zellzyklus wurden an dem Stamm CC-7781 durchgeführt, da dieser Algenstamm sich leicht synchronisieren lässt.

Zur vegetativen Vermehrung wurden die Grünalgen in Tris-Acetat-Phosphat gepuffertem Medium (TAP-Medium) kultiviert. Die Zusammensetzung des Kulturmediums ist den nachfolgenden Tabellen zu entnehmen. Zur Sterilisation wurde frisch angesetztes TAP-Medium jeweils für eine Stunde bei einer Temperatur von 121°C autoklaviert.

**Tabelle 12:** TAP-Medium (nach GORMAN und LEVINE, 1965)

Substanz	Einwaage [ $\text{l}^{-1}$ ]	Konzentration [mM]
Tris	2,42 g	20,00
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,05 g	0,34
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,30 g	1,21
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,10 g	0,73
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,10 g	0,57
$\text{NH}_4\text{Cl}$	0,40 g	7,48
HUTNER's Spurenelementlösung	1 ml	

Der pH-Wert der Lösung wurde mit Eisessig (etwa 1 ml  $\cdot \text{l}^{-1}$  Medium) auf pH 7,5 eingestellt.

**Tabelle 13:** HUTNER`s Spurenelementlösung, in Abänderung nach HARRIS, 1989).

Substanz	Einwaage [ $\text{l}^{-1}$ ]	Konzentration [mM]
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	50 g	147,7
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	22 g	76,5
$\text{H}_3\text{BO}_4$	11,4 g	183,5
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	5,1 g	25,8
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	5 g	17,8
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	1,6 g	6,7
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	1,6 g	6,4
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	1,1 g	0,9

Zur Herstellung der Spurenelementlösung wurden die entsprechenden Salze zunächst in 750 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  gelöst, anschließend zum Sieden erhitzt und abgekühlt. Der pH-Wert wurde mit Kalilauge auf 6,5 bis 6,8 eingestellt und die Lösung anschließend mit Wasser auf einen Liter aufgefüllt. Eventuell ausfallendes Eisen wurde durch Filtration entfernt.

#### 4.1.2 Stammkulturen

Stammkulturen wurden in Reagenzgläsern mit 10 ml TAP-Medium ohne zusätzliche Belüftung gezogen. Zum Erhalt von Synchronkulturen wurden die Algen bei 25°C einem 12-stündigen Licht-Dunkel-Wechsel unterzogen, wobei die Lichtstärke 12.000 Lux entsprach. In Abhängigkeit von der Menge Stammkultur, mit der angeimpft wurde, benötigen die Algen eine unterschiedliche Zeitdauer um eine optimale Dichte zu erreichen. Als geeignet erwies sich hierbei, neues Medium in einem 3,5-tägigem Rhythmus mit jeweils 250  $\mu\text{l}$  Kultur anzupfen.

#### 4.1.3 Belüftungskulturen

Belüftungskulturen wurden unter permanenter steriler Luftzufuhr in 0,5 l, 2 l, bzw. 5 l großen Erlenmeyerkolben, gefüllt mit jeweils 200 ml, 1 l bzw. 3,5 l TAP-Medium, angezogen. Die Temperatur und Lichtverhältnisse entsprachen hierbei den für die Stammkulturen beschriebenen Werten. Durch regelmäßiges Umsetzen der Algenkulturen in die entsprechend größeren Kulturgefäße wurde gewährleistet, dass eine Zelldichte von maximal  $2 \cdot 10^6$  Zellen pro ml nicht überschritten wurde. Meistens wurden 500  $\mu\text{l}$  Algenstammlösung in 300 ml TAP-Medium über einen Zeitraum von vier Tagen inkubiert und dann in 3,5 l TAP-Medium überführt. Nach weiteren drei Tagen Inkubation ließen sich die Algen mit einer Zelldichte zwischen 1 und  $2 \cdot 10^6$  Zellen pro ml ernten.

#### 4.1.4 Bestimmung der Zelldichte und der Wachstumsstadien

Teilproben der Kulturen wurden zur Bestimmung der Zelldichte in einer Thomazählkammer mit 0,5% Formaldehyd fixiert und ausgezählt. Der Test wurde verwendet, um die durch Variation in der Animpfmenge unterschiedlich gewachsenen Kulturen auf die oben beschriebene maximale Dichte einzustellen. Die Bestimmung der Wachstumsstadien erfolgte mikroskopisch.

#### 4.1.5 Präparation der perchloratlöslichen Zellwand (PSW)

Die Gewinnung der perchloratlöslichen Zellwand aus *Chlamydomonas* wurde modifiziert nach GOODENOUGH *et al.* (1986) durchgeführt [48]. Die Belüftungskulturen der Algen mit einem Volumen von etwa 200 l (pro Versuchsansatz) und einer Zelldichte von etwa  $2 \cdot 10^6$  Zellen pro ml wurden zur Sedimentation der Zellen über einen Zeitraum von 24 Stunden bei 4°C aufbewahrt. Anschließend wurde das Medium abdekantiert und die Algen durch Zentrifugation (10 min, 5.000\*g, 4°C) sedimentiert. Das Algensediment wurde nun zweimal mit jeweils zwei Litern destilliertem Wasser gewaschen und erneut abzentrifugiert (10 min, 5.000\*g, 4°C). Danach wurden die Algen in etwa 800 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> resuspendiert, mit dem gleichen Volumen an 2 M Natriumperchloratlösung versetzt und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Den Rohextrakt der perchloratlöslichen Zellwand erhielt man nach erneuter Zentrifugation (10 min, 10.000\*g, 4°C) im Überstand. Dieser wurde für drei Tage bei 4°C gegen mehrfach gewechseltes Wasser dialysiert. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 10.000\*g, 4°C) wurde der Überstand gefriergetrocknet und war so, bei -20°C gekühlt, über mehrere Monate hinweg zu verwenden.



#### 4.1.6 Aggregate der perchloratlöslichen Zellwand

Zur weiteren Reinigung der Perchlorat löslichen Zellwandbestandteile wurden die getrockneten Glykoproteine zunächst in 1 M Natriumperchloratlösung resuspendiert. Hierbei ist unbedingt darauf zu achten, das verwendete Volumen an  $\text{NaClO}_4$ -Lösung möglichst gering zu halten, um die zur Ausbildung der Aggregate erforderliche Konzentration der Glykoproteine nicht zu unterschreiten. Ideal sind etwa 1 ml chaotrope Lösung für 10 mg Glykoprotein. Unlösliche Rückstände wurden abzentrifugiert (10 min, 15.000\*g, 4°C) und der Überstand über einen Zeitraum von drei Tagen bei 4°C gegen 10 mM EDTA, 0,05 %  $\text{NaN}_3$  dialysiert. Die dabei entstandenen Glykoproteinaggregate wurden anschließend durch Zentrifugation (10min, 15.000 \*g, 4°C) gewonnen (1. Reinheitsstufe). Die Gewinnung einer zweiten Reinheitsstufe erfolgte analog.

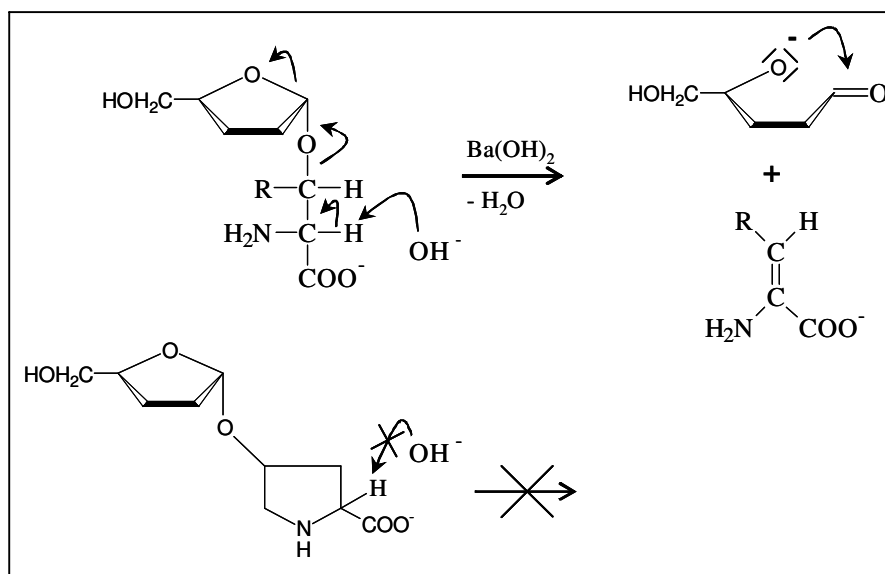
#### 4.1.7 Hydroxyprolin gebundene Glykane aus *Arabidopsis thaliana*

Die in dieser Arbeit verwendeten *Arabidopsis thaliana*-Zellen, standen zu Beginn der Dissertation bereits zur Verfügung. Es handelt sich hierbei um ein etwa 200g schweres gewaschenes Sediment einer zuvor abzentrifugierten *Arabidopsis thaliana* Zell-Kultur. Die Zell-Kultur selber wurde zuvor mit einem Elicitor (*Phytophthora Megasporea*) zu einer gesteigerten Extensinproduktuion angeregt.

Die Hydroxyprolin gebundenen Glykane aus *Arabidopsis thaliana* wurden durch alkalische Hydroyse der gesamten Zellkultur freigesetzt. Hierzu wurde das nasse Sediment nach Zusatz von einem Liter 0,44 N Bariumhydroxid-Lösung wie in Kapitel 4.1.8 beschrieben, verarbeitet.

#### 4.1.8 Alkalische Hydrolyse der Glykoproteine mit $\text{Ba}(\text{OH})_2$

Die Hydroxyprolin gebundenen Glykane wurden durch alkalische Hydrolyse der Glykoproteine gewonnen. Im Gegensatz zur Hydrazinolyse hat diese Methode den Vorteil, dass keine freien Glykane entstehen. Dadurch bleibt die Information erhalten, welche Zucker an Hydroxyprolin gebunden vorliegen (Abbildung 92).



**Abb. 92:** Mechanismus der  $\beta$ -Eliminierung.

Die Präparation der Hydroxyprolinglykoside erfolgte in Anlehnung an HANKE [91]. Die getrockneten Aggregate der PSW bzw. der höher gereinigten Aggregate des 2.Assembly's wurden zur alkalischen Hydrolyse mit 0,44 N  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -Lösung (250 ml/g Protein) versetzt und über einen Zeitraum von 20 Stunden unter Rückfluss gekocht. Daraufhin wurde das Hydrolysat mit 2 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  neutralisiert, der  $\text{BaSO}_4$ -Niederschlag durch Zentrifugation ( $12.000 \times g$ , 15 min,  $4^\circ\text{C}$ ) entfernt und der Überstand gefriergetrocknet.

#### 4.1.9 Reinigung der Hydroxyprolin gebundenen Glykane durch Aminex-Kationenaustauschchromatographie

Die Aminex-Kationenaustauschchromatographie wurde zunächst dazu verwendet, die an Hydroxyprolin gebundenen Glykane aus dem alkalischen Hydrolysat von den anderen Aminosäuren der Glykoproteine zu trennen. Darüber hinaus zeigen die Elutionsprofile der Chromatographien, dass zugleich eine Vortrennung der Zuckerstrukturen selber über das Größenausschlußprinzip vorgenommen werden konnte. Im Verlauf der Arbeiten an *Chlamydomonas* Zellwandpräparationen wurde die Methode der Aminexchromatographie zur Verbesserung der Trennleistung über das Größenausschlußprinzip optimiert. Die Optimierung liegt hierbei in der Vergrößerung der Elutionsvolumina und in der Verlängerung der Laufzeit mit entsprechend flacheren Elutionsgradienten. Gradienten mit verlängerter Laufzeit, wurden vor allem bei solchen Untersuchungen verwendet, bei denen die über Kationenaustauschchromatographie vorgetrennten Verbindungen keiner weiteren Reinigung über HPLC unterzogen wurden. Dies gewährleistet, eine überschaubare Anzahl an Verbindungen in den gebildeten Aminex-Fractionen.

Bei der Reinigung Hydroxyprolin gebundener Glykane aus Glykoproteinen einer höheren Reinheitsstufe wurde aufgrund des geringen Anteils an Substanzmenge auf eine Vortrennung der Glykane verzichtet und die Aminexchromatographie in entsprechend kleinerem Maßstab durchgeführt, um ausschließlich die Aminosäuren der Hydrolyse zu entfernen.

Zur Chromatographie wurden die getrockneten Proben in möglichst wenig 0,1 N HCl resuspendiert und so auf die nachfolgend beschriebenen Chromatographiesäulen aufgetragen.

#### 4.1.9.1 Aminex-Chromatographie von Hydroxyprolin gebundenen Glykanen der Perchlorat löslichen Zellwand (PSW)

Zur Fraktionierung von Hydroxyprolinglykanen aus Glykoproteinhydrolysaten der PSW wurde das getrocknete Hydrolysat (3g) in 10 - 15 ml 0,1 N HCl resuspendiert und auf eine Kationenaustauschersäule (2cm Ø, 37 cm Länge, *Aminex AG 50 W-X8*, Bio Rad) aufgetragen. Für die verschiedenen Experimente wurden dabei unterschiedliche Versuchsparameter verwendet. Eluiert wurde immer mit einem linearen Gradienten von 0,1 - 0,5 N HCl. Jedoch unterscheiden sich die verschiedenen Gradienten in den Elutionsvolumina und der daraus resultierenden Gesamtelutionszeit. Zur Analyse der aus *Arabidopsis* isolierten Glykane sowie zur Einzelzuckeranalyse einiger aus *Chlamydomonas* isolierter Verbindungen wurde ein Gesamtelutionsvolumen von jeweils 800 ml verwendet. Für die Komplettanalysen der Monomierzusammensetzung, beispielsweise bei der Analyse stadienspezifischer Glykosylierungsunterschiede von Zoosporen und Sporangien aus *Chlamydomonas* (Kapitel 2.5 aber auch Kapitel 2.3 und 2.4), wurde das Gesamtelutionsvolumen zur besseren Trennung, vor allem der kürzeren Hydroxyprolin gebundenen Glykane, auf zwei Liter heraufgesetzt. Bei beiden unterschiedlichen Gradienten wurden bei einer Flussrate von 0,8 ml/min etwa 6 ml große Fraktionen gesammelt, deren Hydroxyprolingehalt mit Hilfe der in 4.2.2 beschriebenen Methode ermittelt wurde. Anschließend wurden die relevanten Signalfraktionen vereinigt mit NaOH neutralisiert, gefriergetrocknet und wie nachstehend beschrieben über eine P2-Biogel-Chromatographie entsalzt.

Zum Entsalzen der Aminexfraktionen wurden die neutralisierten Lyophilisate dieser Fraktionen in etwa 5 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> aufgenommen und die klare Lösung (ggf. wurden Rückstände durch Zentrifugation entfernt) auf eine mit P2-Biogel-Material der Firma Biorad gefüllte Säule (2cm Ø, 80 cm Länge) aufgetragen. Unter Elution mit destilliertem Wasser bei einer Flussrate von 0,3 ml/min und einem Elutionsvolumen von 300 ml wurden etwa 3 ml große Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen wurden anschließend erneut auf ihren Gehalt an Hydroxyprolin untersucht (4.2.2), relevante Fraktionen wurden vereinigt und gefriergetrocknet.

#### 4.1.9.2 Aminex-Chromatographie von Hydroxyprolin gebundenen Glykanen aus Glykoproteinhydrolysaten der zweiten Reinheitsstufe

Zur Anreicherung der Hydroxyprolinglykane aus den Glykoproteinhydrolysaten der zweiten Reinheitsstufe wurde das Hydrolysat (100 mg) in 1-2 ml 0,1 N HCl resuspendiert und auf eine Kationenaustauschersäule (2cm Ø, 5 cm Länge, *Aminex AG 50 W-X8*, Bio Rad) aufgetragen. Eluiert wurde mit einem diskontinuierlichen Gradienten von 0,1-0,5 N HCl mit jeweils 5 ml HCl bei aufsteigender Konzentration (0,1 N, 0,2 N, 0,3 N, 0,4 N, 0,5 N; Elutionsvolumen 25 ml). Das Eluat wurde bei einer Flussrate von 0,8 ml/min in entsprechend fünf Fraktionen eines Volumens von 5 ml aufgefangen. Die Bestimmung des Hydroxyprolingehaltes wurde anschließend mit Hilfe der in Kapitel 4.2.2 beschriebenen Methode durchgeführt. Die hydroxyprolinhaltigen Fraktionen wurden schließlich vereinigt, mit NaOH neutralisiert und lyophilisiert.

Zum Entsalzen wurden die neutralisierten Lyophilisate dieser Fraktionen in etwa 1-2 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> aufgenommen und die klare Lösung (ggf. wurden Rückstände durch Zentrifugation entfernt) auf eine mit P2-Biogel-Material der Firma Biorad gefüllte Säule (2 cm Ø, 13,5 cm Länge) aufgetragen. Unter Elution mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> bei einer Flussrate von 0,5 ml/min und einem Elutionsvolumen von 80 ml wurden etwa 1 ml große Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen wurden anschließend wiederum auf ihren Gehalt an Hydroxyprolin untersucht (Kapitel 4.2.2). Relevante Fraktionen wurden vereinigt und gefriergetrocknet.

#### 4.1.10 Trennung von Hydroxyprolinglykosiden durch *High Performance Liquid Chromatographie* (HPLC)

Die Trennung von Hydroxyprolin gebundenen Glykanen über HPLC wurde in Anlehnung an die von KILZ (1999) entwickelte Methode mit Hilfe einer Aminopropylphase (*Nucleosil-300-NH<sub>2</sub>*; Firma Macherey-Nagel) durchgeführt [53]. Aufgrund der für die NMR-Studien erforderlichen hohen Substanzmengen war es nötig das von Kilz entwickelte System auf einen semipräparativen Maßstab umzustellen. Hierzu wurde eine Chromatographiesäule mit einem Innendurchmesser von 8 mm und einer Länge von 25 cm verwendet. Eingesetzt wurden jeweils 2-5 mg der HypGlykane säulenchromatographisch aufgearbeiteter Hydrolysate (Kapitel 4.1.9). Die Elution erfolgte mit einem Laufsystem aus Acetonitril und Wasser (sterilfiltriert und im Ultraschallbad entgast). Der ursprüngliche Gradient wurde zunächst den präparativen Bedingungen angepasst. Zusätzlich wurde der Gradient zur Gewinnung der Reinfractionen kürzerer Glykane (Kapitel 2.1 und 2.2) mehrfach optimiert. Nachstehend dargestellt ist der zuletzt verwendete Stufengradient, der zur Trennung der Cis- und Trans-Hydroxyprolin gebundenen kürzeren Glykane die besten Resultate ergab.

**Tabelle 14:** HPLC-Gradient zur Trennung Cis- und Trans-Hydroxyprolin gebundener, kürzerer Hydroxyprolin gebundener Glykane (Kapitel 2.1 und 2.2). Bei einer Flussrate von 2 ml/min und bei einem Druck von 60-100 bar, 2 ml große Fraktionen gebildet.

Zeit [min]	% Acetonitril	% Wasser
0	70	30
30	70	30
130	60	40
140	10	90
150	70	30
170	70	30

## 4.2 Bestimmung des Hydroxyprolingehaltes nach Kivirikko

### 4.2.1. Hydroxyprolinbestimmung in großem Maßstab

Bei dem Test nach KIVIRIKKO (1963) wurden 250 µl eisgekühlte Probe mit 250 µl eiskalter 0,35 %iger NaOBr-Lösung versetzt. Nach 10 Minuten wurde die Reaktion durch Zusatz von 25 µl Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>-Lösung gestoppt. Es folgte die Zugabe von 250 µl p-DMAB, danach wurden 125 µl kalte 6 N HCl zugegeben und die Proben für 12 Minuten auf 70°C erhitzt. Sobald diese durch Abkühlen auf Eis, Raumtemperatur erreicht hatten, konnte die Absorption bei einer Wellenlänge von 550 nm bestimmt werden [52]. Eine Eichgerade wurde im Bereich von 10 - 500 µg Hyp/ml erstellt.

**Tabelle 15:** Testlösungen für den Kivirikko-Test.

Lösung	Zusammensetzung
NaOBr-Lösung	3,2 ml Brom wurden in 500 ml eiskalter 5 %iger NaOH gelöst. Diese Stammlösung (2% Brom (m/V)) war nach einer Woche gebrauchsfertig und mehrere Monate haltbar. Vor Gebrauch wurde sie mit kalter 5%iger NaOH zu einer 0,35 %igen Lösung (m/v) verdünnt.
p-DMAB	p-DMAB (p-Dimethylaminobenzaldehyd) 5 % (m/V) in Isopropanol
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> , 3% (m/V) in <i>Aqua bidest.</i>

### 4.2.2 Hydroxyprolinbestimmung in Mikrotiterplatten

In den meisten Fällen wurden Bestimmungen des Hydroxyprolingehaltes aller Chromatographiefraktionen in einem nach Kilz (1999) verkleinertem Maßstab in Mikrotiterplatten durchgeführt. 50 µl Probe wurden in eine gekühlte Mikrotiterplatte gegeben, mit 50 µl 0,35 %iger NaOBr-Lösung versetzt und 10 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurden 10 µl 3%ige Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>-Lösung, dann 50 µl p-DMAB und 25 µl 6 N HCl zugesetzt. Die Platte wurde durch einen Deckel mit Gummidichtung fest verschlossen, vorsichtig geschüttelt und 30 min bei 70°C inkubiert. Die Bestimmung der Absorption erfolgte im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 550 nm gegen eine Hydroxyprolin-Eichreihe (0-200 µg/ml Hyp).

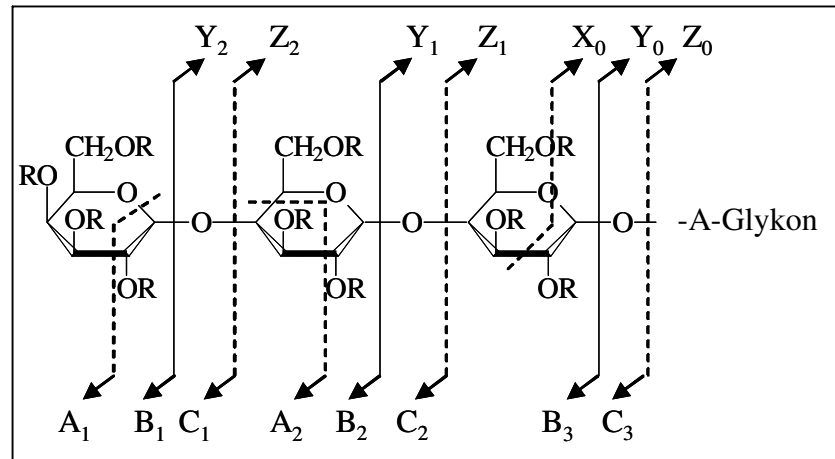
### 4.3 ESI-Massenspektrometrie

Die Elektronen-Spray-Ionisation (ESI) gehört zu den homogenen Ionisierungsmethoden und ermöglicht damit im Gegensatz zur Elektronen-Stoß-Ionisation über einen Elektronenspray die Analyse normalerweise nicht unzersetzt verdampfbarer Biomoleküle. Bei der Elektronen-Spray-Ionisation werden in Lösung vorgebildete Ionen als Spray hochgeladener Tropfen unter Atmosphärendruck in die Ionenfalle versprüht. Der Elektronenspray wird dabei durch Anlegen eines elektrischen Potentials von etwa 6 kV am Ende einer Transferkapillare, die zum Analysator führt, erzeugt. Ein angelegter Druckgradient zwischen der Ionenquelle und dem Analysator führt zum Verlust von Lösungsmittelmolekülen aus den Tropfen und erzeugt dabei letztendlich Molekülionen, die in die Gasphase übergehen. Die Masseanalyse dieser Molekülionen erfolgt nun mit Hilfe von elektrischen Feldern, die Ionen in Abhängigkeit ihres Verhältnisses von Masse zu Ladung  $[m/z]$  durch den Analysator passieren lassen.

Neben der direkten Masseanalyse erlaubt der Einsatz einer Ionenfalle eine genauere Untersuchung der Molekülionen. Durch ein dreidimensionales elektrisches Feld werden in der Ionenfalle Ionen geringer kinetischer Energie auf stabilen Bahnen gehalten und akkumuliert. Die Selektion von Ionen bestimmter  $m/z$ -Verhältnisse gelingt dabei durch die Kombination von an zwei verschiedenen Elektroden angelegter Hochfrequenzspannung und Wechselspannung. Durch Erhöhung der Stromfrequenz werden die selektierten Molekülionen resonant angeregt. Durch Kollision der angeregten Ionen mit den Atomen eines zugesetzten Badegases (Helium) kann die innere Energie der Molekülionen soweit gesteigert werden, dass die Molekülionen fragmentieren ( $MS^2$ -Experiment). Diese Tochterionen sind selber aufgrund ihres veränderten  $m/z$ -Verhältnisses in der Ionenfalle nicht mehr stabil, verlassen die Ionenfalle und werden am Detektor gemessen. Durch Selektion der bei einem  $MS^2$ -Experiment entstehenden Tochterionen können diese aber auch erneut resonant angeregt und so weiter fragmentiert werden ( $MS^n$ -Experimente).

Die kollisionsinduzierte Fragmentierung von linearen und verzweigten Glykanen wurde von Domon und Costello beschrieben [55]. Abbildung 93 zeigt die Nomenklatur dieser Fragmentionen.

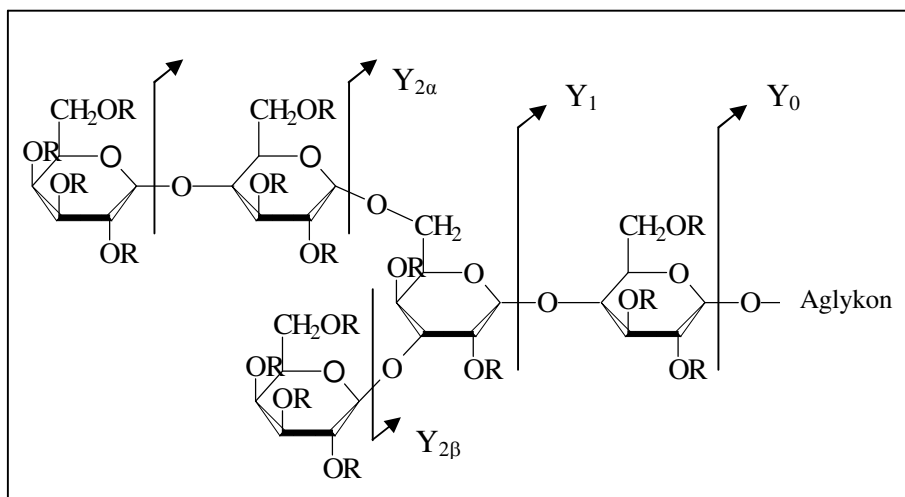




**Abb.93:** Nomenklatur von ESI-MS<sup>n</sup>-Fragmenten von linearen Glykanen nach Domon und Costello.

Fragmente, die durch Bruch der glykosidischen Bindung entstehen werden mit B<sub>i</sub> oder C<sub>i</sub> (Ladung verbleibt jeweils am nicht reduzierenden Ende) beziehungsweise Y<sub>i</sub> oder Z<sub>i</sub> (Ladung verbleibt jeweils am reduzierenden Ende) bezeichnet. Die Fragmente A<sub>i</sub> oder X<sub>i</sub> entstehen bei Bindungsbrüchen innerhalb des Zuckerringes. Der tiefgestellte Index i kennzeichnet, welche glykosidische Bindung ausgehend vom Aglykon gebrochen wurde, wobei die glykosidische Bindung zum Aglykon mit 0 beziffert wird.

Treten verzweigte Zucker auf, so werden die so genannten Antennen in Abhängigkeit ihrer Masse mit griechischen Buchstaben benannt (M<sub>α</sub> ≥ M<sub>β</sub> ≥ M<sub>γ</sub> usw.). Fragmente, die bei Bindungsbrüchen der Antennen entstehen, werden mit dem entsprechendem Symbol als tiefgestellten Index bezeichnet (Y<sub>iα</sub> oder Y<sub>iβ</sub>). In Abbildung 94 sind hierzu lediglich die Y-Fragmentationen aufgeführt, da fast ausschließlich diese Ionenserie bei der Fragmentierung Hydroxyprolin gebundener Glykane zu beobachten ist.



**Abb. 94:** Nomenklatur von ESI-MS<sup>n</sup>-Fragmenten von verzweigten Glykanen nach Domon und Costello.

Bei der massenspektrometrischen Analyse der aus *Arabidopsis thaliana* und *Chlamydomonas* isolierten Glykane lassen sich hauptsächlich die Wasserstoff- ( $H^+$ ) beziehungsweise Natriumaddukte ( $Na^+$ ) der HypGlykane im positiven Modus bestimmen. Die ESI-MS-Messungen wurden an einem LCQ der Firma Finnigan MAT durchgeführt.

### 4.3.1 Probenvorbereitung zur ESI-MS-Analyse

Zur massenspektrometrischen Analyse von Hydroxyprolin gebundenen Glykanen wurden die entsprechenden Fraktionen in einer Evoaporatorzentrifuge (*Speed-Vac*) getrocknet und anschließend in einer 50%igen methanolischen Lösung aufgenommen. Die Konzentration an Hydroxyprolin wurde hierzu auf etwa 100 nmol/ml eingestellt. Durch Zusatz von Essigsäure auf eine Endkonzentration von 0,05 M wurden die für Ionisation der Glykane nötigen sauren Bedingungen geschaffen. Durch gezielten Zusatz von Natriumacetat auf eine Konzentration von 0,05 mM konnte darüber hinaus eine höhere relative Intensität der Hydroxyprolin-glykoside in Form ihrer  $Na^+$ -Addukte erreicht werden (KILZ 1999) [53].

### 4.4 Gaschromatographische Analyse von Hydroxyprolin gebundenen Glykanen

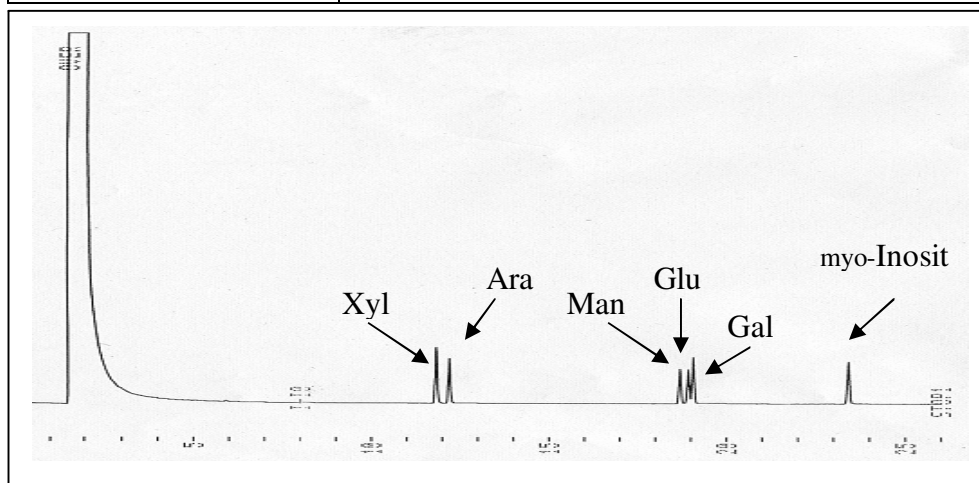
Die gaschromatographische Analyse der trimethylsilylierten Zuckeralditole von Hydroxyprolin gebundenen Glykanen dient der Bestimmung der Monomerbestandteile der Glykane. Zur Probenvorbereitung wurden je 100  $\mu$ l der wässrigen HypGlykan-haltigen Proben mit einer Konzentration von etwa 1 mg/ml wurden in Schraubampullen mit PTFE (Polytetrafluoroethylen)-beschichteter Gummidichtung zunächst mit 50  $\mu$ l myo-Inositol (1 mg/ml) als interner Standard versetzt. Als externe Standards wurden die Monosaccharide Xylose, Arabinose, Mannose, Glukose und Galaktose verwendet. Die Hydrolyse der Oligosaccharide erfolgte durch Zugabe des gleichen Volumens an 4 N TFA (Trifluor-essigsäure) und einstündiger Inkubation bei 125°C. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung bei 60°C unter leichtem Druckluftstrom getrocknet. Die Entfernung von TFA gelang durch zweimalige Zugabe von 200  $\mu$ l Methanol<sub>abs.</sub> und anschließendem Trocknen unter Stickstoffstrom (60°C). Die Reduktion der Monosaccharide erfolgte bei Raumtemperatur durch Zugabe von 400  $\mu$ l frisch hergestellter  $NaBH_4$  (Natriumborhydrid)-Lösung (5 mg/ml) und anschließender dreistündiger Inkubation.

Das überschüssige Hydrid wurde durch Zusatz von ein bis zwei Tropfen Eisessig hydrolysiert. Die Entfernung des dabei entstandenen Borates erfolgte durch mindestens viermaliges Trocknen nach Zugabe von je 200 µl essigsauerm Methanol (1% Eisessig (V/V)) bei 60°C. Anschließend wurden die Proben im Exsikkator über P<sub>4</sub>O<sub>10</sub> (Phosphorpentoxid) getrocknet. Zur Derivatisierung der Zuckeralditole wurden je 100 µl MSTFA (N-Methyl-N-Trimethylsilyltrifluoracetamid) zugesetzt. Die Proben wurden nun für eine Stunde bei 100°C inkubiert. Die Vorbereitung der Zuckerstandards erfolgte analog.

Die gaschromatographische Trennung erfolgte überwiegend an einer unpolaren Phenyl-Methyl-Silicon-Säule des Typs DB-5 (50m\*0,32 mm; CS Chromatographie Service) an einem GC 9000 (Fisons Instruments). In Einzelfällen wurde zur besseren Auflösung bestimmter Signale ein anderer Säulentyp (DB-225, 50m\*0,32 mm) verwendet. Injiziert wurde bei jeder Messung 1 µl der vorbereiteten Lösung. Die genauen Messparameter sowie das Gaschromatogramm eines Standardgemisches sind nachstehend abgebildet.

**Tabelle 16:** Versuchsparameter der gaschromatographischen Analyse der HypGlykan -Monomere.

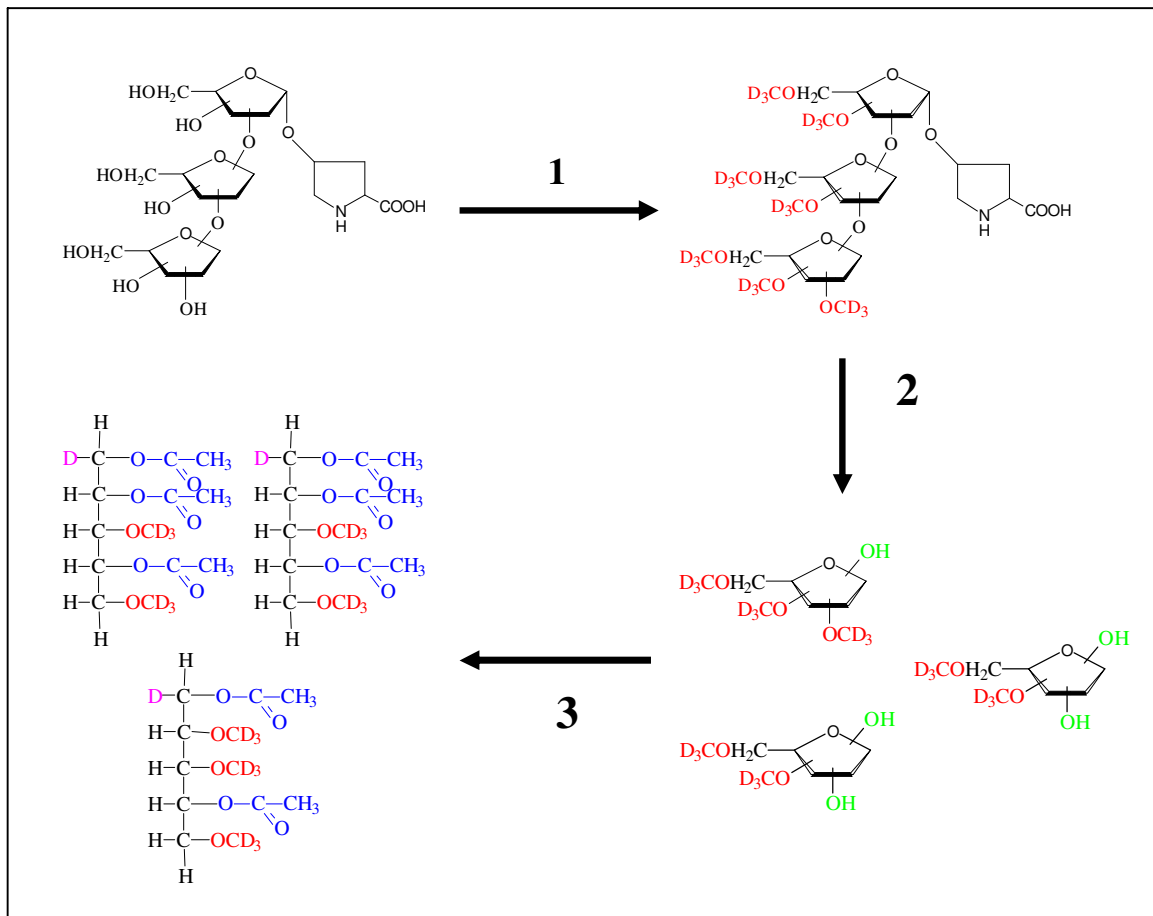
Injektortemperatur:	270°C
Detektortemperatur:	FID (Flammenionisationsdetektor) bei 270°C
Temperaturprogramm:	Anfangtemperatur : 140°C für 3 min Aufheizrate 1: 3°C/min Temperatur 1: 210°C für 1 min Aufheizrate 2: 10°C/min Endtemperatur: 280°C
Trärgas:	N <sub>2</sub> - 1ml/min
Split/Carrierfluss:	10:1



**Abb.95:** Gaschromatogramm der Zuckerstandards. Ara=Arabinose; Man=Mannose; Gal=Galaktose; Glu=Glukose; Xyl=Xylose

#### 4.5 Methylierungsanalyse Hydroxyprolin gebundener Glykane

Mit Hilfe der Methylierungsanalyse der deuteromethylierten, hydrolysierten, reduzierten und acetylierten Zuckeralditole sollten die genauen Verknüpfungspositionen der Zuckermonomere innerhalb eines HypGlykans aufgeklärt werden. Die Methylierungsanalyse wurde in Anlehnung an die Methode von Hakomori durchgeführt, dabei aber stark verändert [92]. Hierbei wurden die Hydroxyprolin gebundenen Glykane zunächst perdeuteromethyliert, um so die freien OH-Gruppen der Zuckerkette entsprechend zu markieren. Eine Perdeuteromethylierung war deshalb erforderlich, weil die untersuchten Zuckerstrukturen eigene Methylgruppen tragen können (Kapitel 2.2) und so Deuteromethylgruppen von diesen natürlich auftretenden natürlichen Methylgruppen über ihren Massenunterschied von 3u unterschieden werden können. Die anschließende Hydrolyse der partiell deuteromethylierten Zuckeralditole legt die Verknüpfungspositionen frei. Durch Reduktion dieser Zwischenprodukte mit Natriumborodeuterid wird zum einen der Ring geöffnet und außerdem durch Deuterierung der C<sub>1</sub>-Position sichergestellt, dass die genaue Orientierung der Zuckerstrukturen zu erkennen ist und kein symmetrisches Produkt entsteht. Sowohl die freigelegten Verknüpfungs- als auch die freigelegte Ringposition werden anschließend durch Acetylierung weiter derivatisiert. Bei dieser Vorgehensweise entstehen je nach Verknüpfung innerhalb der Kette spezifische Derivate der einzelnen Zuckermonomere (Abbildung 96).



**Abb.96:** Derivatisierungsschema am Beispiel eines HypGlykans der Sequenzfolge HypPentose<sub>3</sub>. Freie OH-Gruppen werden zunächst durch Deuteromethylierung maskiert (1), dann wird das HypGlykan hydrolysiert (2) und so die einzelnen Zuckermonomere freigesetzt. Durch Reduktion mit NaBD<sub>4</sub> und nachfolgender Acetylierung mit Acetanhydrid wird der Ring geöffnet und die Hydroxylgruppen der Ringpositionen (C<sub>4</sub> im Falle einer Pentofuranose) sowie die Hydroxylgruppen, der durch die Hydrolyse freigesetzten Kettenpositionen, acetyliert (3).

Die auf diese Weise generierten partiell deuteromethylierten, partiell acetylierten Zucker-alditole wurden nun gaschromatographisch getrennt und massenspektrometrisch analysiert (GC-MS). Bei der massenspektrometrischen Analyse wurden die derivatisierten Monomere durch Elektronenstoßionisation (EI) fragmentiert. Bei den so messbaren Fragmentionen treten überwiegend Hauptfragmentionen (mit Bindungsbrüchen zwischen den Kohlenstoffatomen des Zuckerrückgrades) und Umlagerungsfragmentionen (McLafferty-Fragmente mit Bindungsbrüchen des Zuckerrückgrades bei gleichzeitiger Umlagerung von benachbarten Seitengruppen) auf. Die Art und Weise wie die Bindungsbrüche bei der dargestellten Methode erfolgen, ist dabei abhängig von den jeweiligen Bindungsenergien im untersuchten Molekül aber auch von methodischen Parametern wie der Ionisierungsenergie oder der Beschleunigungsspannung. Zur Verdeutlichung sind nachstehend die theoretischen

Hauptfragmentionen für die 1,2 verbundene Arabinose, dem Zuckermonomer mit dem größten Anteil an der Gesamtzuckermasse der untersuchten Verbindungen dargestellt (Abbildung 97, A). Daneben zeigt der rechte Teil der Abbildung die Entstehung zweier der zahlreich auftretenden McLafferty-Fragmente bei einem Bindungsbruch des Derivates unterhalb von Kohlenstoff-position C<sub>2</sub>, bei gleichzeitiger Umlagerung der Acetylgruppe von C<sub>2</sub> auf C<sub>3</sub> (Abbildung 97, B).

<u>Hauptfragmentionen</u>	<u>McLafferty-Fragmentionen</u>
<p><b>A</b></p>	<p><b>B</b></p>

**Abb.97:** Theoretische Fragmentationen bei der EI-Fragmentierung einer 1,2-verknüpften Pentofuranose nach entsprechender Aufarbeitung zum 1,2,4 Tri-O-Acetyl-1-Deuterio-3,5-Di-O-Deuteromethylpentosid. A: mögliche Hauptfragmentationen. B: Beispiel eines McLafferty-Fragmentes bei einem Bindungsbruch unterhalb von Position C<sub>2</sub> des Zuckerrückrades und gleichzeitiger Umlagerung einer Acetylgruppe von C<sub>2</sub> auf C<sub>3</sub>.

#### 4.5.1 Derivatisierungsprotokoll für die Methylierungsanalyse Hydroxyprolin gebundener Glykane

Das nachstehende Protokoll zur Methylierungsanalyse Hydroxyprolin gebundener Glykane, das aufgrund der Vielzahl an einzelnen Arbeitsschritten tabellarisch dargestellt wird, wurde in Anlehnung an die Methode von Hakomori mehrfach modifiziert. Die Methode ist gut reproduzierbar, setzt aber mit Ausnahme der Waschschrte absolut wasserfreie Lösemittel und Reagenzien voraus. Zur Methylierungsanalyse wurden ausschließlich Feinchemikalien und gereinigtes Wasser verwendet. Zur Methylierungsanalyse wurden die Proben auf einen Hydroxyprolingehalt von 100 µg eingestellt und in 2 ml großen Gaschromatographie-Probengefäßen aus Glas zunächst unter Stickstoffstrom, später im Exsikkator über Phosphopentoxid getrocknet.

Bei dem zur Katalyse der Methylierungsreaktion, in der ersten Stufe der Derivatisierung verwendeten Katalysator handelt es sich um das durch Hydrierung erhaltene Anion von Dimethylsulfoxid (DMSO). Dieses Dimethylsulfinylanion ist derzeit nicht erhältlich und musste daher hergestellt werden.

Die Herstellung erfolgte durch Umsetzung von Natriumhydrid in DMSO. Hierzu wurden zu 2,2 g NaH, in einem Dreihalskolben mit Trockenrohr, 30 ml DMSO zugesetzt (Konzentration etwa 3M). Der Versuch wurde in einem Ölbad mit Magnetrührer durchgeführt. Die Erhöhung der Temperatur auf 70-75°C startet die Hydrierungsreaktion, die beendet ist wenn kein molekularer Wasserstoff mehr freigesetzt wird (Die Temperatur ist genau einzuhalten !). Bei dem Reaktionsprodukt handelt es sich um eine gelblich-graue Masse, die wasserfrei und bei 4°C eingefroren über einen Zeitraum von einigen Monaten verwendet werden kann.

## Derivatisierungsprotokoll

Als Probengefäße wurden ausschließlich 2 ml große Gaschromatographie Probengefäße aus Glas verwendet, die sobald erforderlich, mit Kunststoffdeckeln verschlossen wurden. Diese Kunststoffdeckel waren zur Probe hin mit einer PTFE-Dichtung versehen. Zum Trocknen und als Schutzgas wurden die Proben bei einigen Schritten mit Stickstoff überblasen. Der Stickstoffstrom sollte hierbei über einem Probengefäß ein Volumen von wenigen ml pro Minute nicht überschreiten. Für die Trockenschritte ist alternativ auch Druckluft zu verwenden, jedoch sollte hierbei die Reinheit der verwendeten Druckluft kontrolliert werden.

**Tabelle 17:** Derivatisierungsprotokoll der Methylierungsanalyse.

Schritt	Arbeitsbeschreibung	
1.	100µg Probe in Probengefäß vorlegen, unter N <sub>2</sub> -Strom trocknen und im Exsikkator über P <sub>4</sub> O <sub>10</sub> über Nacht resttrocknen.	<b>Deuteromethylierung</b>
2.	Zusatz von 100µl DMSO + 100µl DMSO-Anion, für einen Zeitraum von 1 Stunde bei Raumtemperatur geschlossen inkubieren, leicht schütteln.	
3.	Auf Eis kühlen, 100µl MeD <sub>3</sub> J zusetzen.	
4.	Probe mit N <sub>2</sub> überblasen und verschließen, für 2 Stunden bei Raumtemperatur leicht schütteln.	
5.	Gefäß öffnen und zur Entfernung von überschüssigem MeD <sub>3</sub> J bei 35°C für 30 min mit N <sub>2</sub> -überblasen.	
6.	Über Nacht trocknen über P <sub>4</sub> O <sub>10</sub> (Exsikkator).	
7.	3 mal: Zusatz von je 500µl Chloroform und 500 µl H <sub>2</sub> O, ausschütteln und jeweils wässrige (obere) Phase verwerfen.	<b>Saure Hydrolyse</b>
8.	Organische Phase unter N <sub>2</sub> -Strom bei Raumtemperatur trocknen, Zusatz von 100µl 0,5 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> in 90% Essigsäure.	
9.	Mit N <sub>2</sub> überblasen, Gefäß verschließen und im Ofen für 6-7 Stunden bei 80°C inkubieren.	
10.	Im Eisbad kühlen, Zusatz von 130µl 0,5 N NaOH und 200µl Ethanol.	
11.	Bei 35°C unter N <sub>2</sub> -Strom trocknen, evtl. mehr Ethanol zugeben um schneller zu trocknen.	



12.	Zusatz von 300µl NaBD <sub>4</sub> (10 mg/ml) in 0,1 N NaOH, Gefäß verschlossen und bei 4°C gekühlt über Nacht verwahren.	<b>Deuteroreduktion</b>
13.	Zusatz von 1 bis 2 Tropfen konzentrierter Essigsäure.	
14.	Trocknen unter N <sub>2</sub> -Strom bei 35°C, evtl. Zusatz von Ethanol, um schneller zu trocknen.	
15.	5 mal: Zusatz von 500µl 1% essigsäurem Methanol und jeweils trocknen bei 35°C im N <sub>2</sub> -Strom (evtl. öfter, Probe muss ganz trocken sein!).	
16.	Resttrocknen über Nacht im Eksikkator über P <sub>4</sub> O <sub>10</sub> .	
17.	Zusatz von 300µl Acetanhydrid, mit N <sub>2</sub> überblasen, verschließen und im Heizblock bei 100°C für 2 Stunden inkubieren.	<b>Acetylierung</b>
18.	Abkühlen auf Raumtemperatur, bei <u>35°C</u> unter N <sub>2</sub> -Strom, bei gelegentlicher Zugabe von je 200µl Toluol (maximal 1-2 ml) trocknen.	
19.	3 mal: Zusatz von je 500µl Chloroform und 500 µl H <sub>2</sub> O ausschütteln und jeweils wässrige (obere) Phase verwerfen.	
20.	Die organische Chloroform-Phase enthält die Derivate und ist über die GC-MS-Analyse direkt verwendbar.	<b>GC-MS-Messung</b>
21.	Alternativ kann die organische Phase bei <u>35°C</u> unter N <sub>2</sub> -Strom getrocknet, kühl gelagert und zu späterem Zeitpunkt auch in anderen organischen Lösemitteln wie Methylenchlorid aufgenommen werden.	

## 4.5.2 Methodische Parameter bei der GC-MS-Analyse

Die gaschromatographischen Parameter der GC-MS-Analysen sind in Tabelle 18 aufgeführt.

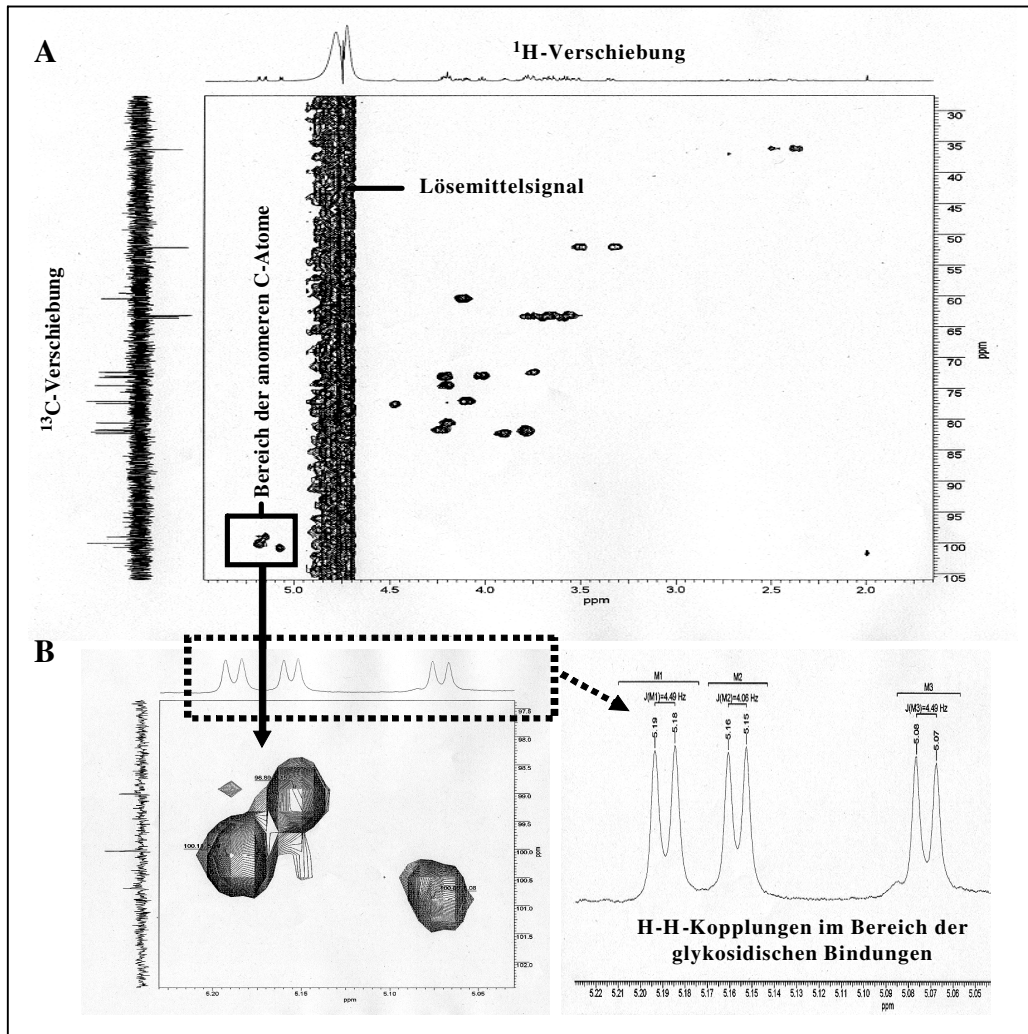
**Tabelle 18:** Parameter der gaschromatographischen Trennung.

Injektortemperatur:	70°C - 280°C (Transfertemperatur)
Detektor:	EI <sup>+</sup> -Detektion
Temperaturprogramm:	Anfangtemperatur : 70°C für 1 min Aufheizrate 1: 1°C/min Temperatur 1: 76°C Aufheizrate 2: 6°C/min Endtemperatur: 325°C für 10 min
Trärgas / -fluß	N <sub>2</sub> - 1 ml/min
Split/Carrierfluß:	25:1

## 4.6 Magnetische Kernresonanzspektrometrie

### 4.6.1 H-C-Cosy-Messungen

Die ein- und zwei-dimensionalen NMR-Experimente wurden am Institut für organische Chemie der Universität zu Köln in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Berkessel durchgeführt, dem an dieser Stelle mein Dank gilt. Die Messungen erfolgten an den Systemen *Bruker Avance DPX 300* (<sup>1</sup>H: 300 MHz, <sup>13</sup>C: 75 MHz) und *Bruker Avance DRX 500* (<sup>1</sup>H: 500 MHz, <sup>13</sup>C: 125 MHz) bei 25°C (Kontrollexperiment von Seite 54 bei 50°C). Zur Messung wurden die trockenen Proben in einem Gemisch aus D<sub>2</sub>O und H<sub>2</sub>O gelöst (Verhältnis (v/v) 1:9). Die H-C-Cosy-Korrelation der Messung von HypAra<sub>3</sub> aus *Arabidopsis thaliana* ist nachstehend exemplarisch dargestellt (Abbildung 98).

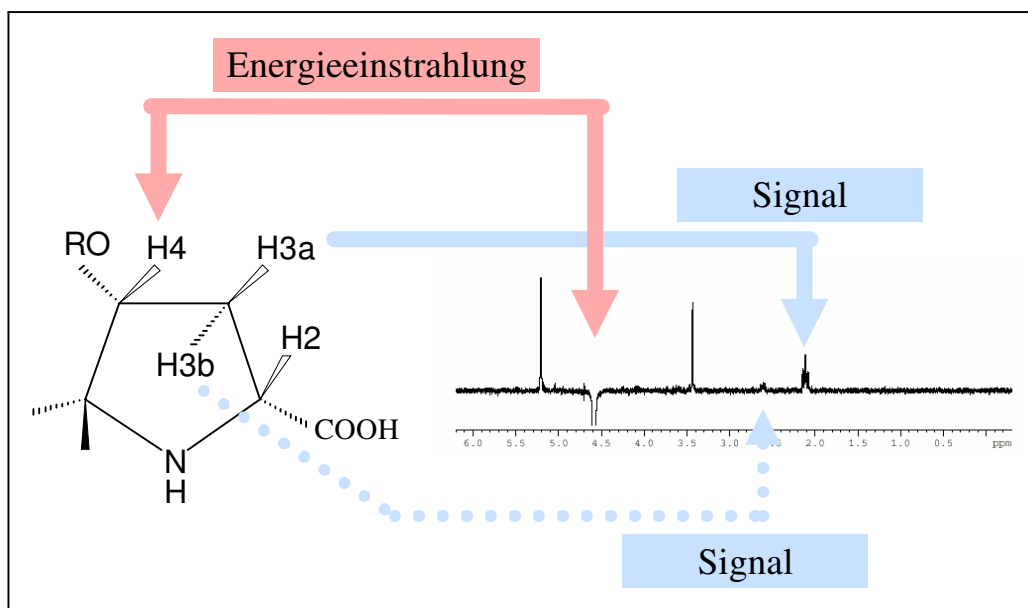


**Abb. 98:** (A): H-C-Korrelation eines Hydroxyprolinegebundenen Glykans mit drei glykosidischen Bindungen. (B): Ausschnitt im Bereich der anomeren C-Atome und Kopplung benachbarter H-Atome in diesem Bereich. Die Werte der chemischen Verschiebung  $\delta$  tragen den Zusatz ppm und ergeben sich aus der Differenz der Messfrequenz und der Frequenz einer Referenzsubstanz (Tetramethylsilan) im Verhältnis zur Larmorfrequenz der Referenzsubstanz. Die Kopplungskonstanten tragen die Einheit Hertz (Hz).

Die Auswertung der Daten erfolgte im Abgleich mit aus der Literatur bekannten Werten. Von besonderer Bedeutung sind hierbei Studien von Agrawal aus dem Jahr 1992 der durch zahlreiche Experimente eine Vielzahl verschiedener Zuckermonomere bezüglich ihrer NMR-Signale beschrieb [59]. Erwähnenswert sind auch die Analysen von Kato, der die Hyp-Glykane HypAra<sub>3</sub> und HypAra<sub>4</sub> aus Tabak durch eindimensionale  $^{13}\text{C}$ -NMR-Analysen beschreiben konnte und damit eine direkte Grundlage zur Untersuchung der entsprechenden Verbindungen in *Arabidopsis thaliana* lieferte [19,20].

## 4.6.2 NOESY-Messungen

Die NOESY-Messungen wurden von Dr. Schweimer am Lehrstuhl für Biopolymere der Universität Bayreuth durchgeführt, dem an dieser Stelle mein Dank gilt. Hierzu wurde das System Bruker Avance 400 MHz verwendet. Die spezielle NMR-Methode liefert Informationen über die genaue chemische Umgebung bestimmter selektierter Protonen eines Moleküls. Bei der NOESY führt die magnetische Stimulation selektierter Wasserstoffkerne zu einem distanzabhängigen Energietransfer dieser stimulierten Kerne hin zu Wasserstoffatomen in unmittelbarer räumlicher Umgebung (Distanz < 0,5 nm). Dieser auf Dipol-Dipol Wechselwirkungen beruhende Energietransfer, ist durch die Beeinflussung des extern angelegten Magnetfeldes messbar. Abbildung 99 zeigt schematisch den Ablauf eines NOESY-Experimentes.



**Abb. 99:** Schema eines NOESY-Experimentes.

Durch kontinuierliches Einstrahlen in einem Bereich von 4,6 ppm (H4) ergibt sich im dargestellten Fall ein Energietransfer (NOE) der im Bereich von etwa 2,1 ppm (H3a) messbar ist. Somit lassen sich die Protonen H4 und H3a in direkter Nachbarschaft nachweisen und erklären in diesem Schema die Cis-Stellung von Hydroxyprolin.

## 4.7 Allgemeine biochemische Arbeitsmethoden

### 4.7.1 Elektrophoretische Methoden

Zur elektrophoretischen Proteintrennung wurden SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophoresen (SDS-Page) nach LAEMMLI durchgeführt, wobei die Gelgröße variiert wurde.

#### 4.7.1.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Diese diskontinuierliche SDS-PAGE wurde modifiziert nach JAENICKE (1984) durchgeführt. Von in Wasser gelösten Proben der PSW und HRGPs wurde zunächst der Proteingehalt bestimmt und danach entsprechend der aufzutragenden Proteinmenge im Verhältnis 1:1 mit Dissoziations-Probenpuffer versetzt. Zur Trennung unter nichtreduzierenden Bedingungen wurde im Probenpuffer auf 2-Mercaptoethanol verzichtet.

**Tabelle 19:** Dissoziations-Probenpuffer.

Stammlösungen	Stamm-Konz. [mol·l <sup>-1</sup> ]	Menge [ml]	Endkonz. [mmol·l <sup>-1</sup> ]	Endgehalt [%]
10 % SDS	0,35	4,0	140,0	4,0 m/V
0,5 M Tris/HCl, pH 6,8	0,50	2,5	125,0	1,5 m/V
0,5 % Bromphenolblau	$7,23 \cdot 10^{-3}$	0,01	$7,23 \cdot 10^{-3}$	0,005 m/V
Glycerin	13,68	2,0	2,73	20,0 V/V
2-Mercaptoethanol	14,34	1,0	1,4	10,0 V/V
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	—	0,49	—	64,0
		Σ 10,0		

Die Proben wurden für 5 Minuten auf 95°C erhitzt und direkt verwendet. Die Elektrophorese wurde im vertikalen Flachbettgel mit einer Schichtdicke von 1,6 cm und einer Fläche von 14\*14 cm<sup>2</sup> durchgeführt. Vor dem Gießen des 7,5 %-igen Trenngels mußte die Gelkammer mit Dichtegel abgedichtet werden. In das gegossene 4%-ige Sammelgel wurde der Probenkamm eingesetzt.

**Tabelle 20:** Dichtegel.

Stammlösungen	Stamm-Konz. [mol·l <sup>-1</sup> ]	Menge [ml]	Endkonz. [mmol·l <sup>-1</sup> ]	Endgehalt [%]
30 % Acrylamid / BIS	4,16	2,00	1350	11,6 m/V
10 % APS	0,44	0,15	10,6	0,24 m/V
TEMED	6,67	0,01	10,8	0,12 m/V
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	—	4,00	—	88
		Σ 5,16		

**Tabelle 21:** Trenngel (7,5%).

Stammlösungen	Stamm-Konz. [mol·l <sup>-1</sup> ]	Menge [ml]	Endkonz. [mmol·l <sup>-1</sup> ]	Endgehalt [%]
10 % SDS	0,35	0,3	3,5	0,1 m/V
30 % Acrylamid / BIS	4,16	7,5	1690	7,5 m/V
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	1,50	7,5	375	4,5 m/V
10 % APS	0,44	0,3	4,4	0,1 m/V
TEMED	6,67	0,015	3,3	0,04 m/V
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	—	14,5	—	85
		Σ 30,115		

**Tabelle 22:** Sammelgel (4%).

Stammlösungen	Stamm-Konz. [mol·l <sup>-1</sup> ]	Menge [ml]	Endkonz. [mmol·l <sup>-1</sup> ]	Endgehalt [%]
10 % SDS	0,35	0,1	3,5	0,1 m/V
30 % Acrylamid / BIS	4,16	1,35	900	4,0 m/V
0,5 M Tris/HCl, pH 6,8	0,50	2,5	125	1,5 m/V
10 % APS	0,44	0,15	6,6	0,15 m/V
TEMED	6,67	0,015	10,0	0,12 m/V
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	—	6,0	—	92
		Σ 10,115		

Während der Fokussierung der Proben im Sammelgel erfolgte die Elektrophorese bei einer Stromstärke von 35 mA. Bei Erreichen des Trenngels wurde die Stromstärke auf 45 mA erhöht. Bei Übernächtläufen wurde die Elektrophorese über eine Spannung von 60 V limitiert.

**Tabelle 23:** Elektrophoresepuffer, pH 8,3.

Stammlösungen	Stamm-Konz. [mol·l <sup>-1</sup> ]	Menge [ml]	Endkonz. [mmol·l <sup>-1</sup> ]	Endgehalt [%]
10 % SDS	0,35	10	3,5	0,1 m/V
0,5 M Tris, pH 8,3	0,50	50	25	0,3 m/V
10 % Glycin	1,92	100	192	1,4 m/V
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	—	840	—	98
		Σ 1000		

#### 4.7.1.2 SDS-Minigelelektrophorese

Zur Herstellung der Minigele (Schichtdicke 1,6 mm; 5,5 \* 8,5 cm<sup>2</sup>) wurden die zuvor aufgeführten Lösungen zu jeweils einem Fünftel der dort angegebenen Menge verwendet. Während der Fokussierung der Proben im Sammelgel erfolgte die Elektrophorese bei einer Stromstärke von 10 mA. Sie wurde auf 15 mA erhöht, nachdem die Laufmittelfront das Trenngel erreicht hatte.

#### 4.7.1.3 Gelelektrophoretische Molekulargewichtsbestimmung

Das apparente Molekulargewicht von Proteinen wurde aus ihrem Wanderungsverhalten bei der SDS-PAGE ermittelt. Dazu wurden parallel zu den Proteinbanden Standardprotein-gemische aufgetragen. Hierzu wurden die nachfolgend beschriebenen HMW-Marker (High-Molecular-Weight-Marker) und LMW-Marker (Low-Molecular-Weight-Marker) verwendet.

**Tabelle 24:** Proteinmarker bei der Gelelektrophorese.

HMV-Marker		LMV-Marker	
Proteine	Molekulargewicht [kDa]	Proteine	Molekulargewicht [kDa]
Myosin (Kaninchen-Muskel)	205	Albumin (Rind)	66
β-Galactosidase ( <i>Escherichia Coli</i> )	116	Albumin (Hühnerei)	45
Phosphorylase b (Kaninchen-Muskel)	97,4	Glycerinaldehyde-3- P-Dehydrogenase	36
Albumin (Rind)	66	Carboanhydrase (Rind)	29
Albumin (Hühnerei)	45	Trypsinogen (Rinderpankreas)	24
Carboanhydrase (Rindererythrozyten)	29	Trypsin Inhibitor (Sojabohne)	20
		α-Lactalbumin (Kuhmilch)	14,2

## 4.7.2 Qualitative Proteinbestimmung

### 4.7.2.1 Coomassie-Blaufärbung

Diese von JAENICKE (1984) beschriebene Methode zur unspezifischen Proteinfärbung sieht folgende Schritte vor:

**Tabelle 25:** Coomassie-Blaufärbung.

1. Fixieren	45 % (v/v) Methanol; 10 % (V/V) Essigsäure	mindestens 1 h
2. Färben	45 % (v/v) Methanol; 10 % (V/V) Essigsäure; 0,2 % (m/v) Coomassie Brilliant Blue R-250	1 h
3. Entfärben	20 % (v/v) Methanol; 10 % (V/V) Essigsäure	3 * 2 h
4. Spülen	<i>Aqua bidest.</i>	3 * 1 min

Der Vorteil dieser Methode ist, dass Gele deren Proteinbanden für diese Methode unter der Nachweisgrenze liegen, nach gründlicher Entfärbung anschließend mit der nachfolgend beschriebenen, empfindlicheren Silberfärbung nachgefärbt werden können.

### 4.7.2.2 Silberfärbung

Die nach HEUKESHOVEN und DERNICK (1985) modifiziert durchgeführte Silberfärbung sieht folgende Arbeitsschritte vor:

**Tabelle 26:** Silberfärbung nach Dernick und Heukeshoven.

1. Fixieren	50 % (V/V) Methanol; 12 % (V/V) Essigsäure; 0,05 % (V/V) Formaldehyd	mindestens 1 h
2. Waschen	50 % (V/V) Ethanol	4 * 20 min
3. Vorbehandeln	0,2 % (m/V) Natriumthiosulfat	1 - 2 min
4. Spülen	<i>Aqua bidest.</i>	3 * 1 min
5. Färben	0,2 % (m/V) Silbernitrat; 0,075 % (V/V) Formaldehyd	30 min
6. Spülen	<i>Aqua bidest.</i>	3 * 1 min
7. Entwickeln	6 % (m/V) Natriumcarbonat; 0,05 % (V/V) Formaldehyd; 0,004 % (m/V) Natriumthiosulfat	bis zu 10 min
8. Stoppen	50 % (V/V) Methanol; 12 % (V/V) Essigsäure	10 min
9. Waschen	50 % (V/V) Methanol	1 h
10. Spülen	<i>Aqua bidest.</i>	3 * 1 min



### 4.7.3 Quantitative Proteinbestimmung

Von den nachfolgend beschriebenen Methoden wurde in der Regel die Proteinbestimmung nach LOWRY / PETERSON durchgeführt, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Die anderen Methoden dienten als Kontrolle oder wurden nur in speziellen Fällen verwendet.

#### 4.7.3.1 Mikro-Lowry

Diese empfindliche Methode wurde von PETERSON (1977) entwickelt. Eine optimale Proteinquantifizierung erreicht man bei einer Proteinkonzentration von 10 bis 50  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

Folgende Lösungen wurden verwendet:

**Tabelle 27:** Lowry-Lösungen.

Lösung 1:	0,8 M NaOH
Lösung 2:	10 % SDS
Lösung 3:	Cu-Tartrat-Reagenz: 0,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ + 1 g K-Na-Tartrat in 250 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ lösen und Zusatz des gleichen Volumens an 20%iger $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung.
Lösung 4:	20 % (V/V) Folin-Ciocalteu-Reagenz

Zu 400  $\mu\text{l}$  Proteinprobe wurden 400  $\mu\text{l}$  eines frisch angesetzten Gemisches der Micro-Lowry-Lösungen 1, 2 und 3, sowie *Aqua bidest.* im Verhältnis 1:1:1:1 gegeben. Nach genau 10 Minuten wurden jeweils 200  $\mu\text{l}$  Folin-Reagenz (Lösung 4) zugesetzt und das Gemisch für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die durch Reduktion des Folinreagenzes entstehende blaue Färbung wurde dann photometrisch bei einer Wellenlänge von 750 nm gemessen. Zur Quantifizierung der Proteinkonzentration wurde jeweils eine BSA-Verdünnungsreihe (0, 10, 20, 25, 40 und 50  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) erstellt und daraus die Eichgerade ermittelt.

#### 4.7.3.2 Mikro-Biuret

Die Modifizierung dieser Methode geht auf GORNALL et al. (1949) zurück. Folgende Lösungen wurden verwendet:

**Tabelle 28:** Biuret-Lösungen.

Lösung 1:	173 g tri-Natriumcitrat * 2 H <sub>2</sub> O und 173 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> sowie 1,5 g CuSO <sub>4</sub> * 5 H <sub>2</sub> O in 500 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> lösen.
Lösung 2:	6 % (m/V) NaOH

Zu 500 µl Proteinlösung wurden 500 µl Lösung 2 und anschließend 100 µl Lösung 1 zugesetzt. Nach 15 minütiger Inkubation wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 330 nm bestimmt. Zur Quantifizierung wurde eine Eichgerade mit BSA (Konzentration: 0,1 - 1 µg \* ml<sup>-1</sup>) erstellt.

#### 4.7.3.3 Coomassie-Blaustest

Beim Coomassie-Blau-Test nach Bradford (1976) wurden 100 µl Proteinlösung in einer Mikrotiterplatte mit 100 µl Färbelösung versetzt und für drei bis fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bis eine schwache Blaufärbung der Proben erkennbar war. Zeitgleich wurde eine BSA-Eichreihe (0,05 bis 1,0 µg \* ml<sup>-1</sup>) mit Färbelösung versetzt. Die Absorption der Proben wurde mit einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen.

Färbelösung: 0,06 % (m/V) Coomassie-Brilliant-Blue G-250; 1,9 % (V/V) Perchlorsäure.

### 4.8 Chemikalien und Laborgeräte

#### 4.8.1 Chemikalien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Feinchemikalien und Standardproteine der Hersteller BIORAD, BOEHRINGER, MERCK, SERVA, FLUKA, SIGMA und ROTH verwendet.

## 4.8.2 Laborgeräte

- Autoklav	Varioklav Dampfsterilisator	H+P Labortechnik
- Evaporatorzentrifuge	UVC 150 H	Univapo
- ELISA-Reader	MR 5000	Dynatech
- Fraktionssammler	Model 202	Gilson
	Vitrorac II	LKB
- Gaschromatographie	GC 9000	Fisons Instruments
- Gelrockner	Drygeljunior	HOEFFNER
- HPLC	HPLC-Pump 420	Kontron Instruments
	HPLC-Gradient-Former 425	Kontron Instruments
	Agilent HP-System	Agilent
- Heizblock	Thermostat 5320	Eppendorf
- Kühlbäder	RC 20	Lauda
- Lyophilisator	Lyovac GT 2	Leybold AG
- Leuchtstoffröhren	F96PG17 CW Power Groove	General Elektrik
- Magnetrührer	MR 2002	Gilson
- Massenspektrometrie	LCQ	Finnigan
- Mikroskopie	Dialux 20	Leitz
- Photometrie	U 2000 Spectrophotometer	Hitachi
	UV-VIS-Filter Photometer	Knauer
- pH-Elektrode	pH-Meter 766 Calimatic	Knick
- Rollerpumpe	Minipuls II	Gilson
- Rotoren	GSA	Sorvall
	SS-34	Sorvall
	HFA 2194	Heraeus
	HFA 15250	Heraeus
- SDS-PAGE	Eigenbau des Instituts	
- Schüttler	Thermomixer 5436	Eppendorf
	Vortex-Genie Mixer	Scientific Industries
- Ultraschallbad	Transsonic Digital	Elma/Faust
- Vakuumpumpe	M 72 C	ABM
- Waagen	FA-210-4i	Faust
	Type 1518	Satorius
- Wasseraufbereitung	Clear Plus	Gelman Sciences
- Zentrifugen	Tischzentrifuge 5415	Eppendorf
	Biofuge Pico	Heraeus
	Sepatech Suprafuge 22	Heraeus
	Superspeed RC 2-B	Sorvall

## 5 Datenanhang

### 5.1 Massenspektrometrische Analyse Hydroxyprolin gebundener Glykane

#### 5.1.1 ESI-MS-Analyse von HypGlykanen aus *Arabidopsis thaliana*

(Die dargestellten Strukturen der HypGlykane sind im Ergebnisteil hergeleitet.)

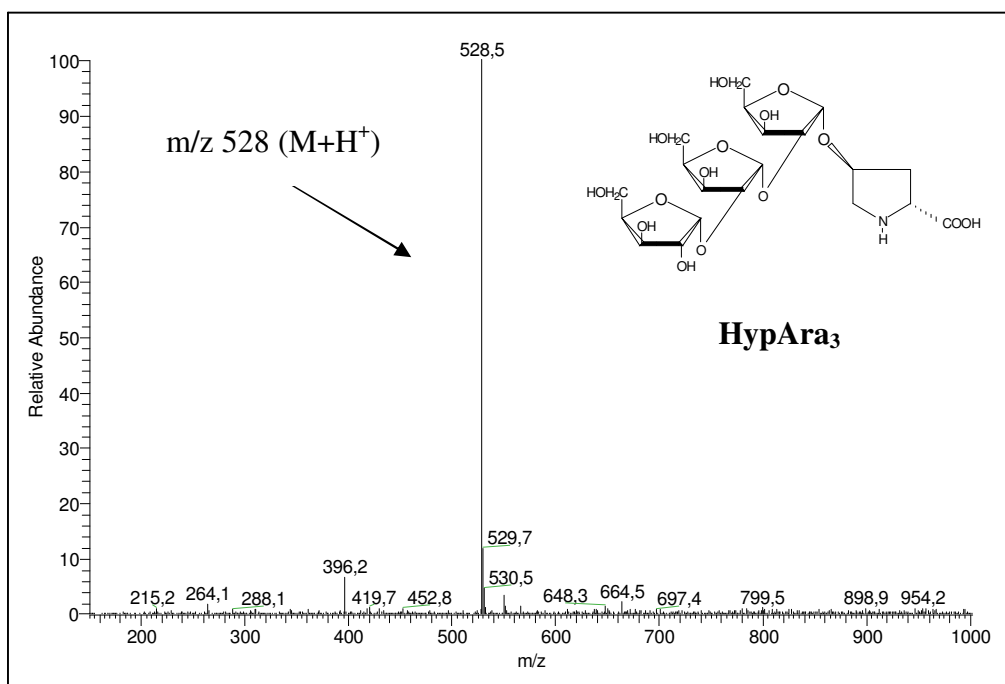


Abb. 100: ESI-MS-Gesamtspektrum von HypAra<sub>3</sub> aus HPLC-Fraktion B1.

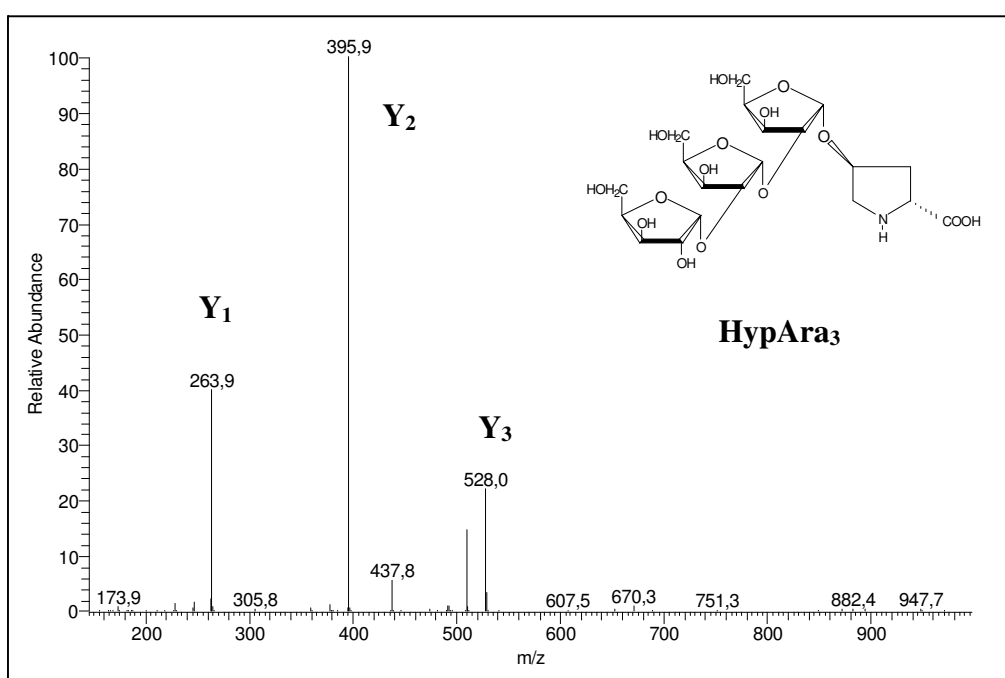


Abb. 101: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum von HypAra<sub>3</sub> aus HPLC-Fraktion B1.

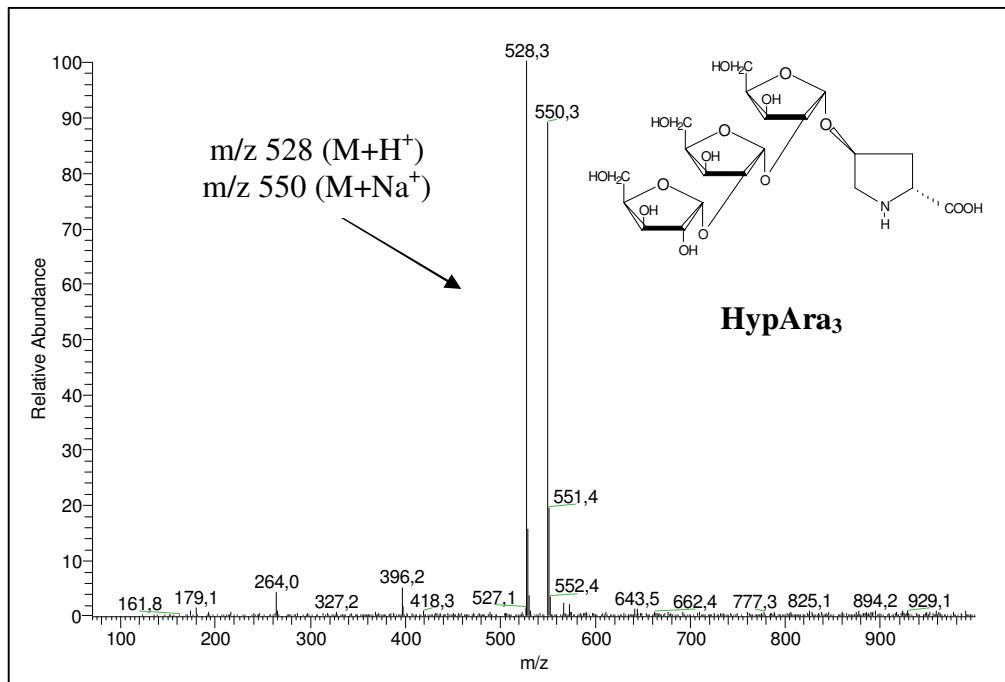


Abb. 102: ESI-MS-Gesamtspektrum von HypAra<sub>3</sub> aus HPLC-Fraktion B2.

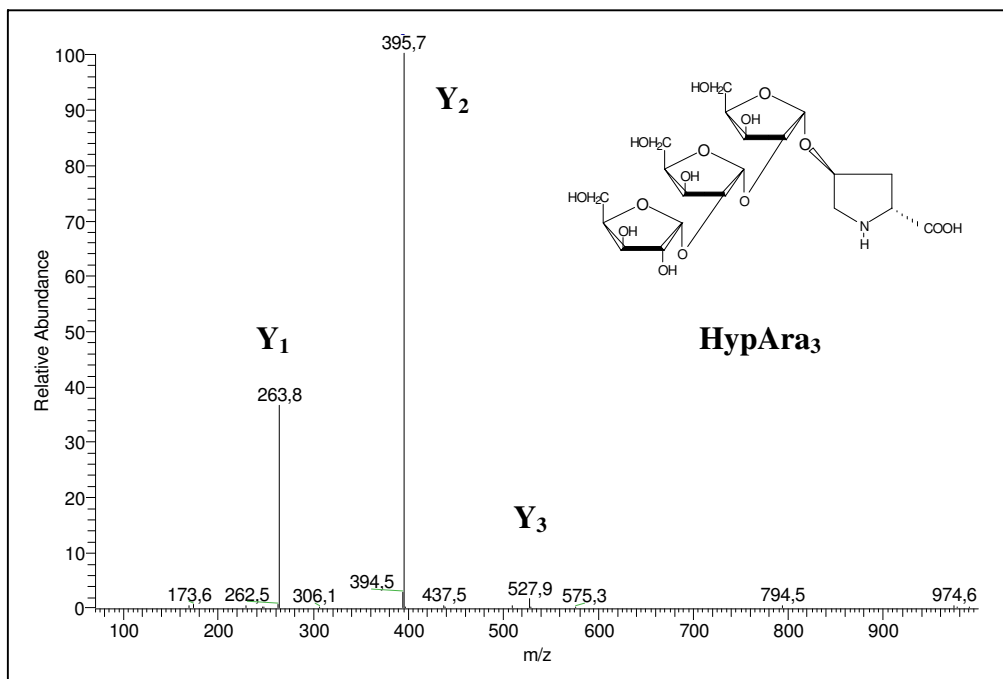


Abb. 103: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum von HypAra<sub>3</sub> aus HPLC-Fraktion B2.

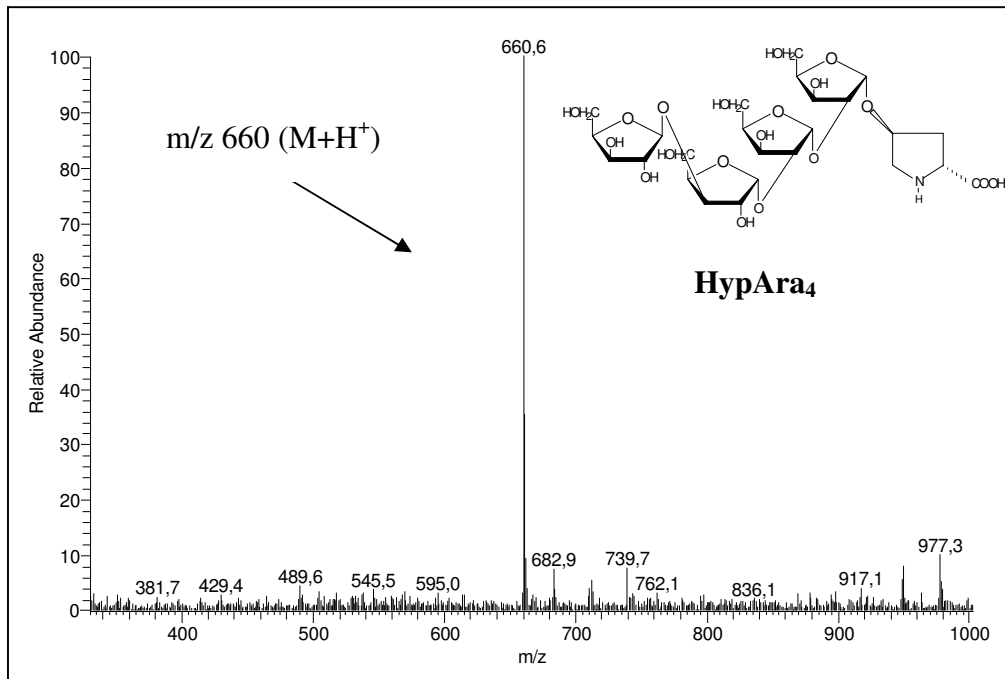


Abb. 104: ESI-MS-Gesamtspektrum von HypAra<sub>4</sub> aus HPLC-Fraktion A1.

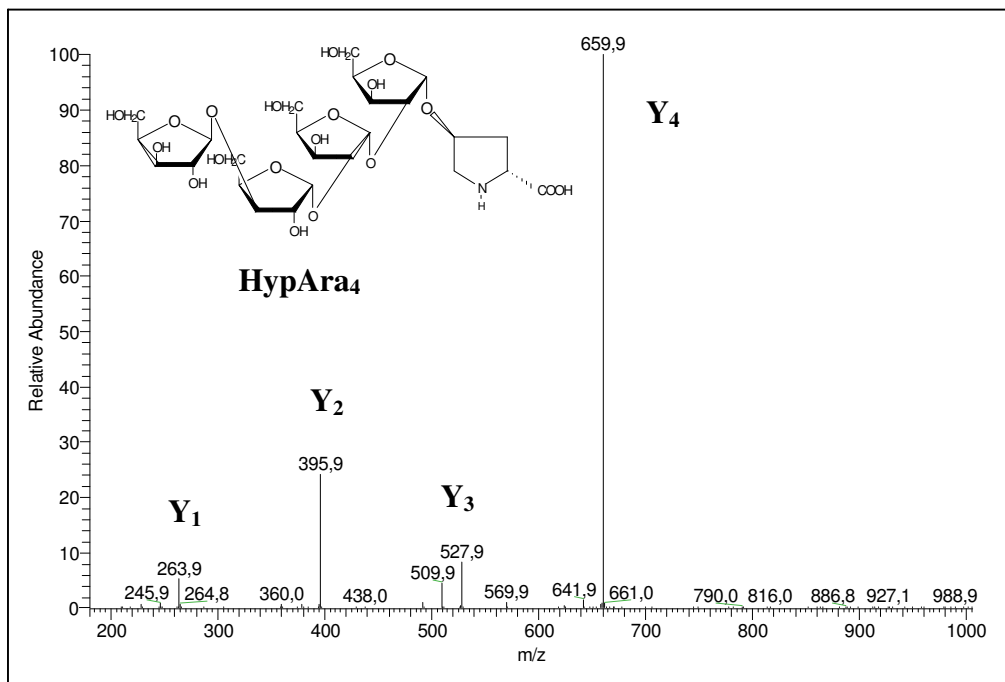


Abb. 105: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum von HypAra<sub>4</sub> aus HPLC-Fraktion A1.

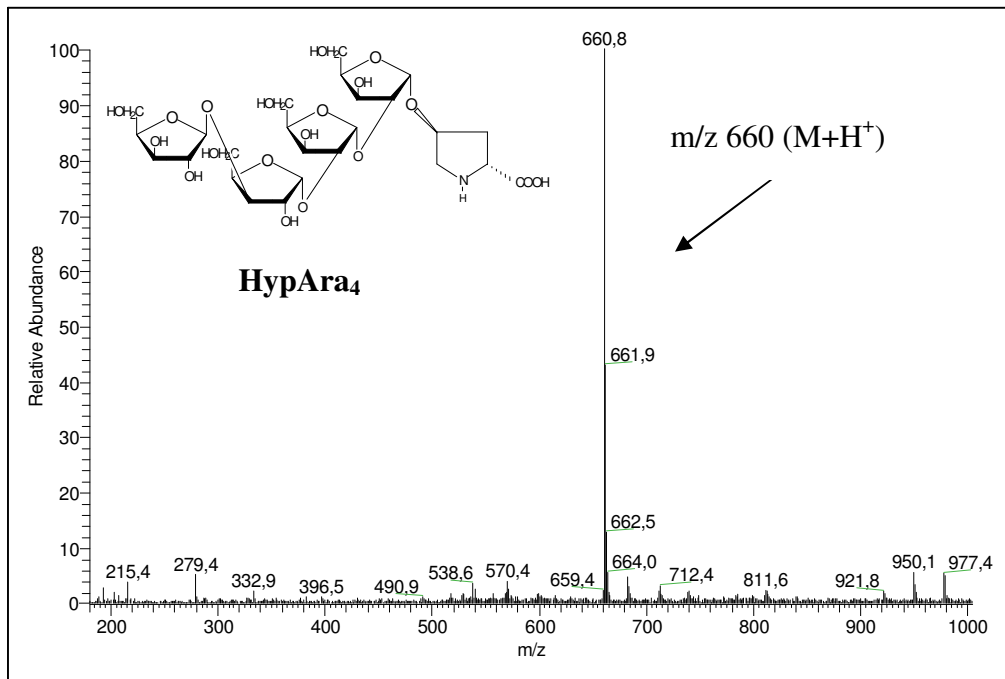


Abb. 106: ESI-MS-Gesamtspektrum von HypAra<sub>4</sub> aus HPLC-Fraktion A2.

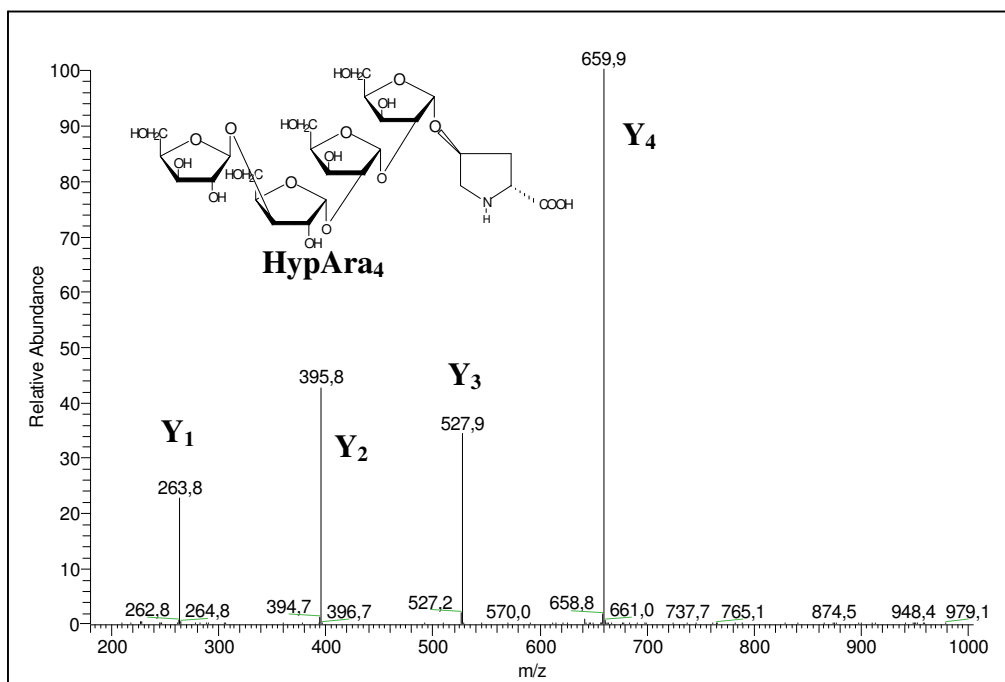


Abb. 107: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum von HypAra<sub>4</sub> aus HPLC-Fraktion A2.

## 5.1.2 ESI-MS-Analysen von HypGlykanen aus *Chlamydomonas reinhardtii* (Die Analysen sind bis zu einer Kettengröße der HypGlykane von vier Zuckermonomeren aufgeführt.)

### 5.1.2.1 ESI-MS-Gesamtspektren

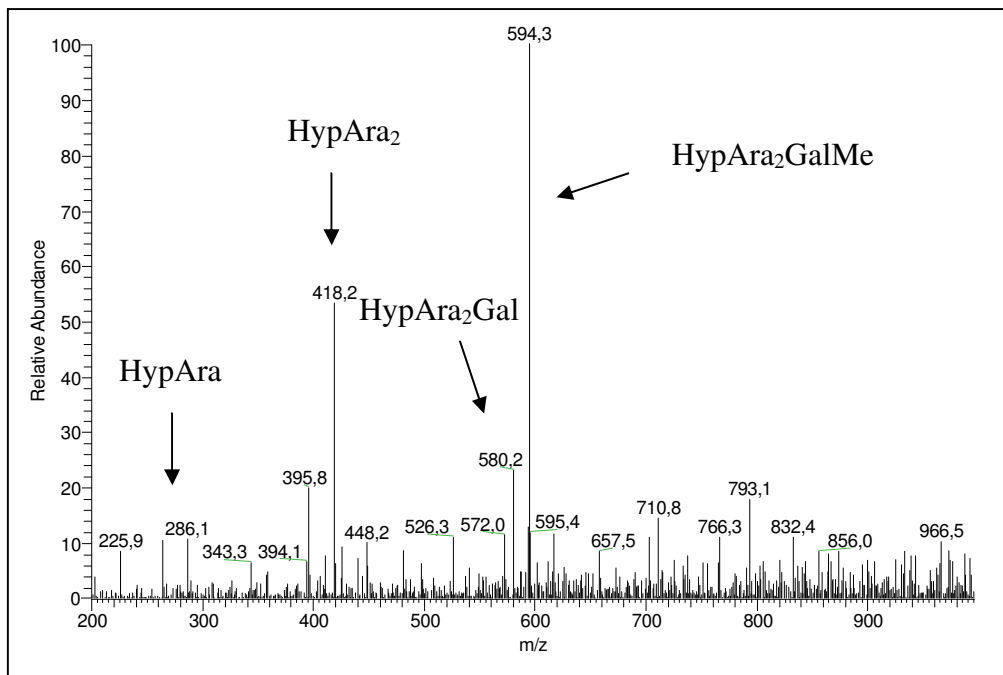


Abb. 108: ESI-MS-Gesamtspektrum von Aminex-Fraktion 8.

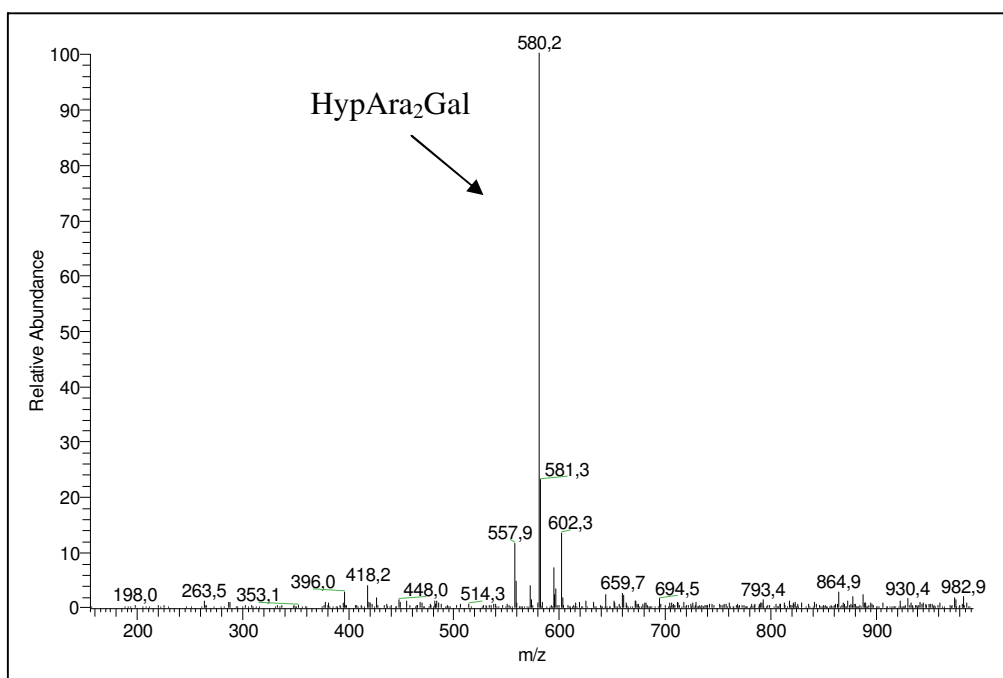


Abb. 109: ESI-MS-Gesamtspektrum von Aminex-Fraktion 7.



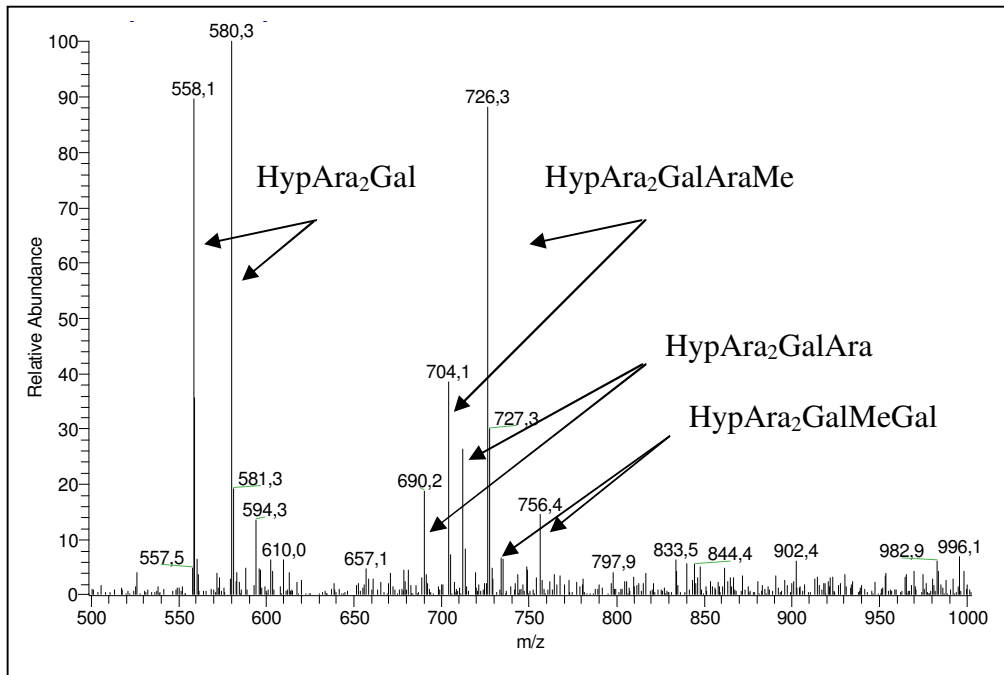


Abb. 110: ESI-MS-Gesamtspektrum von Aminex-Fraktion 6.

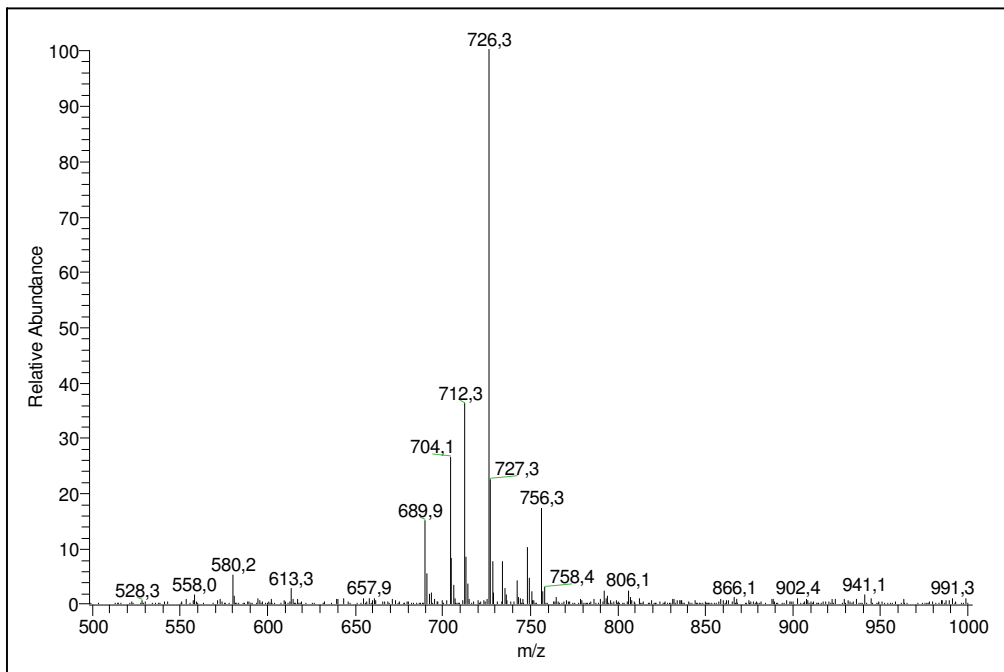


Abb. 111: ESI-MS-Gesamtspektrum von Aminex-Fraktion 5.

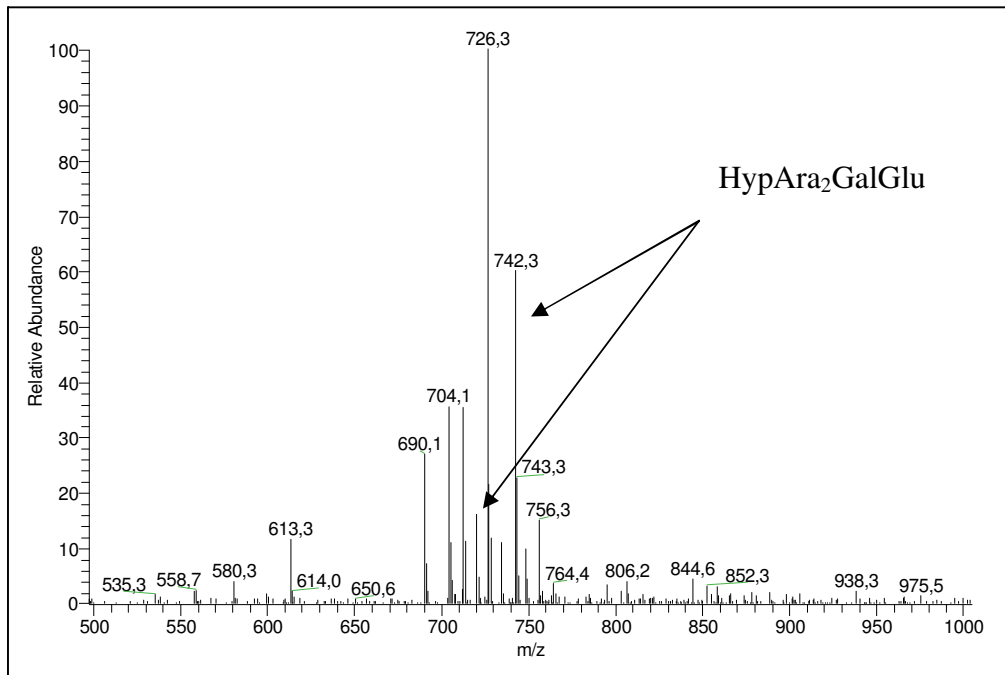


Abb. 112: ESI-MS-Gesamtspektrum von Aminex-Fraktion 4.

### 5.1.2.2 ESI-MS<sup>2</sup>-Stoßfragmentierungen

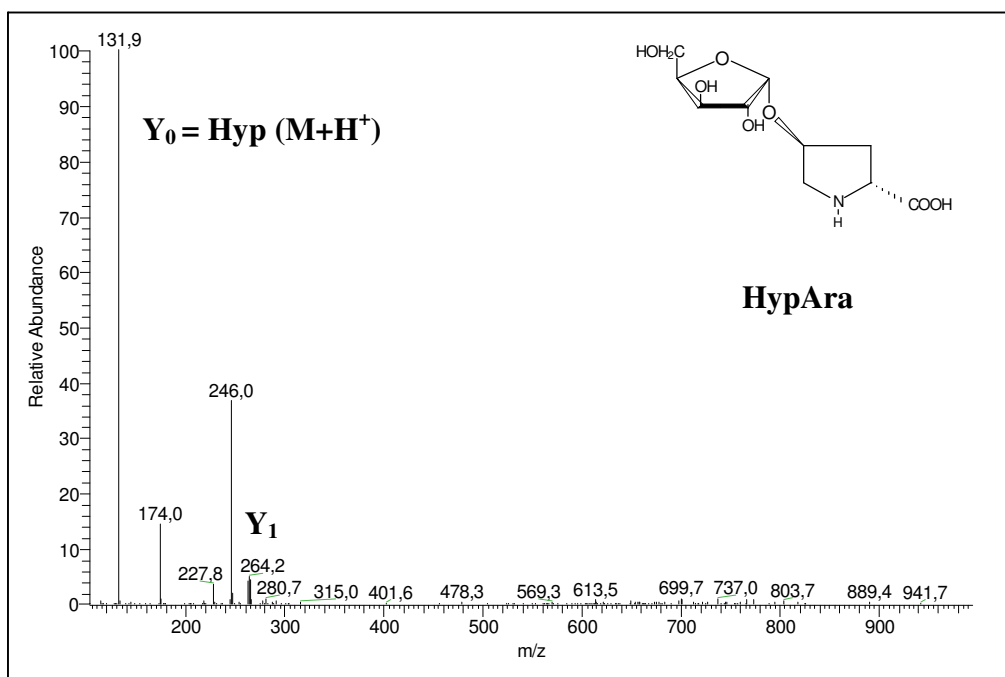


Abb. 113: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum von HypAra aus Aminex-Fraktion 8.

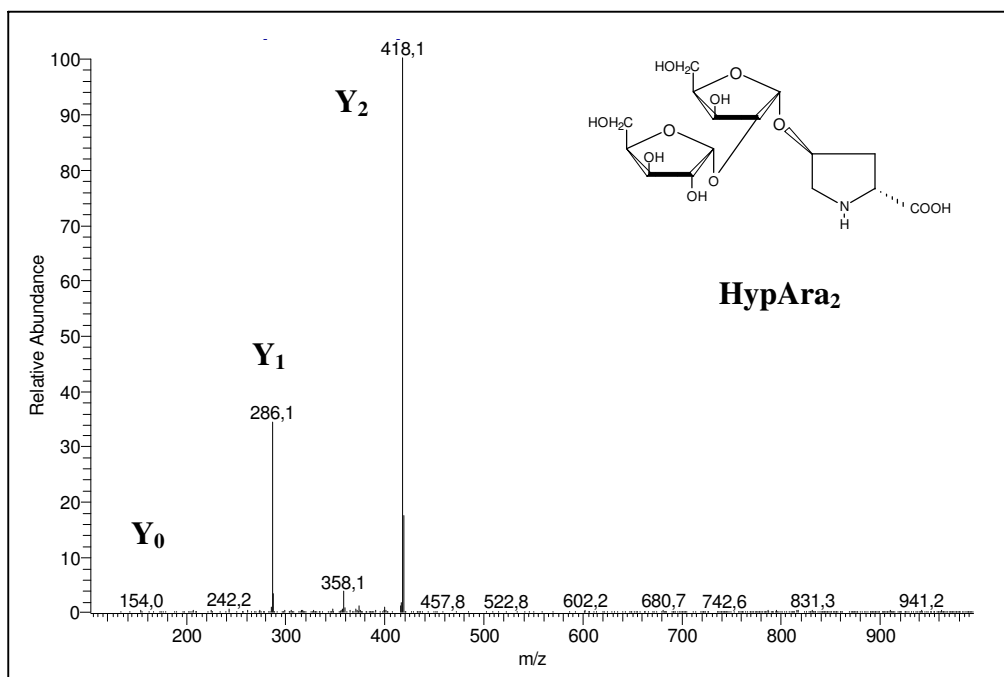


Abb. 114: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum von HypAra<sub>2</sub> aus Aminex-Fraktion 8.

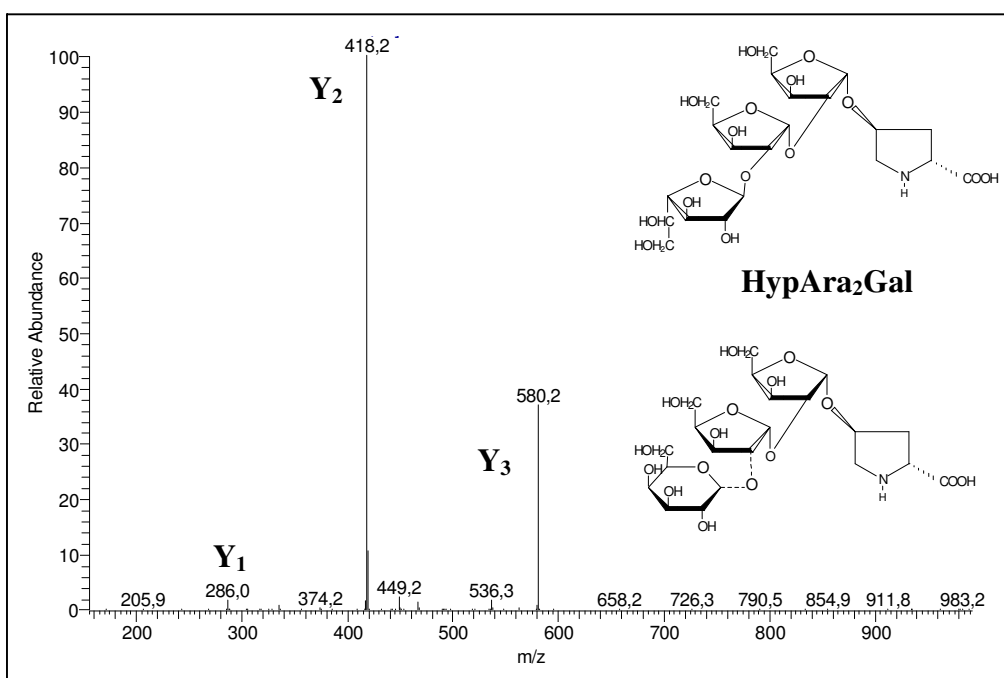


Abb. 115: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum von HypAra<sub>2</sub>Gal aus Aminex-Fraktion 8.

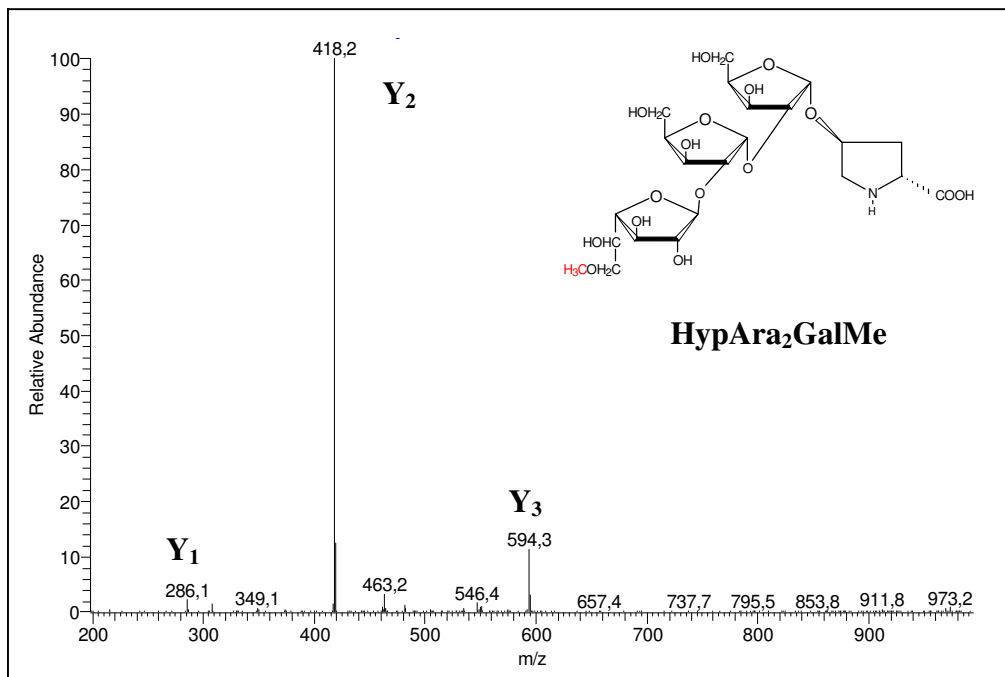


Abb. 116: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum von HypAra<sub>2</sub>GalMe aus Aminex-Fraktion 8.

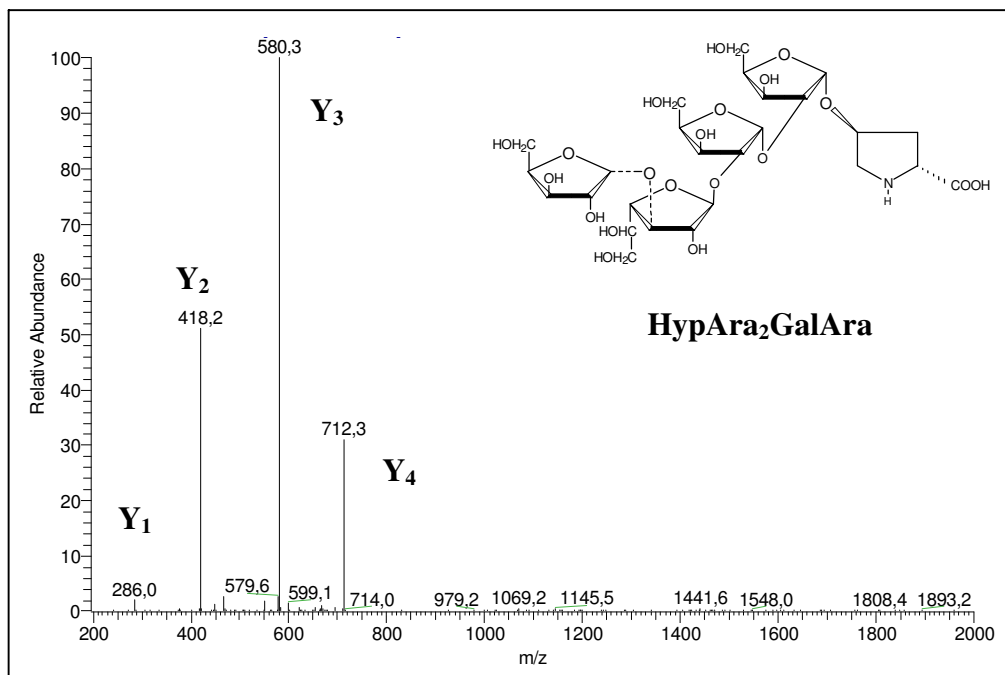


Abb. 117: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum von HypAra<sub>2</sub>GalAra aus Aminex-Fraktion 6.

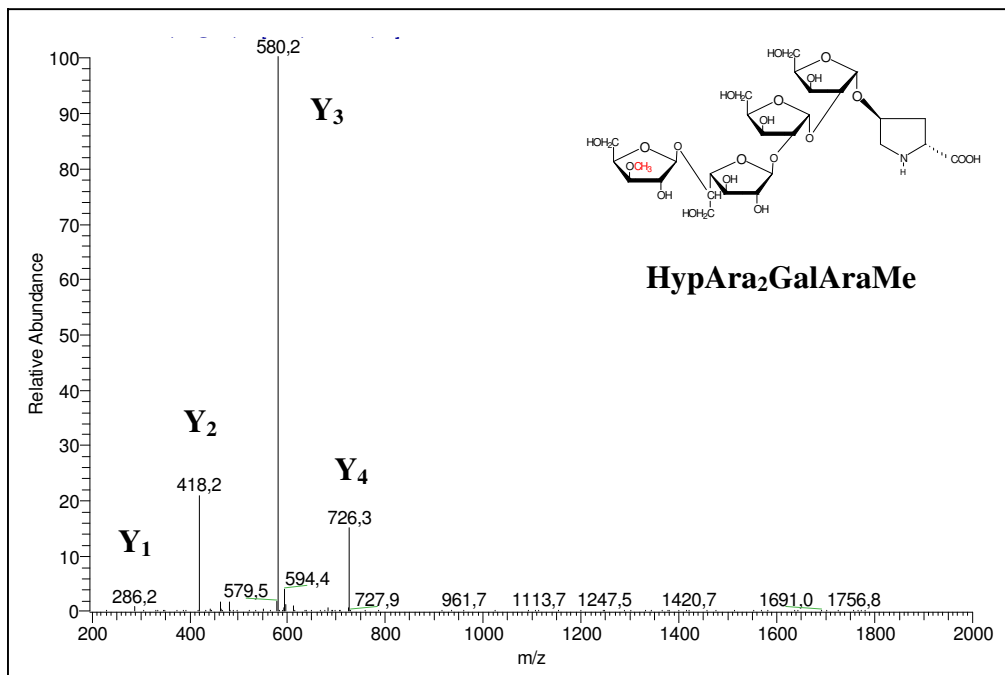


Abb. 118: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum von HypAra<sub>2</sub>GalAraMe aus Aminex-Fraktion 6.

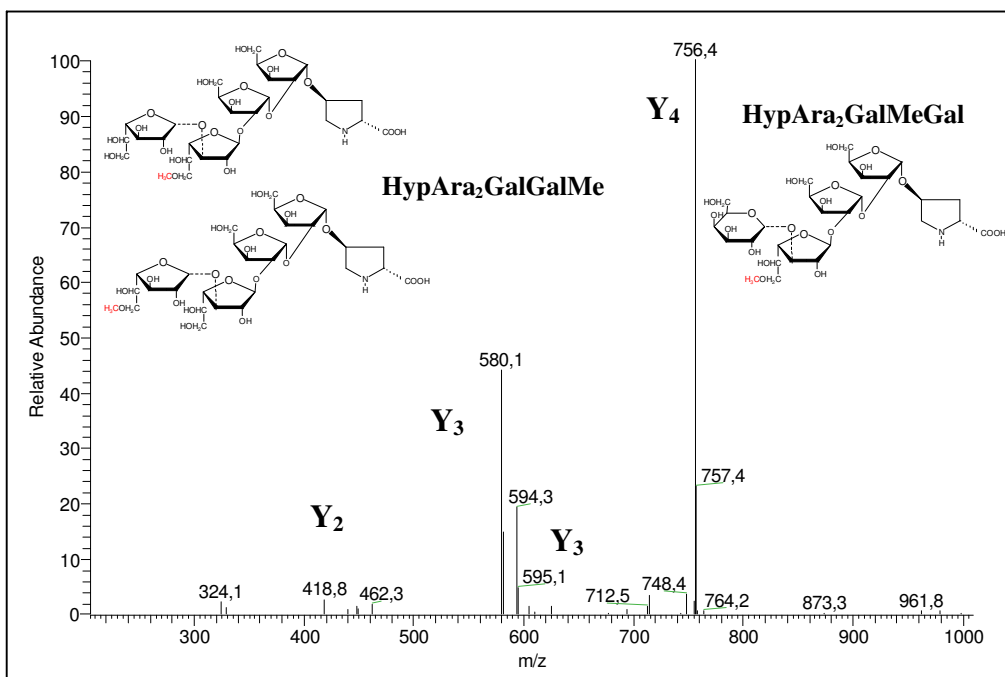


Abb. 119: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum von HypAra<sub>2</sub>GalGalMe und HypAra<sub>2</sub>GalMeGal aus Aminex-Fraktion 6.

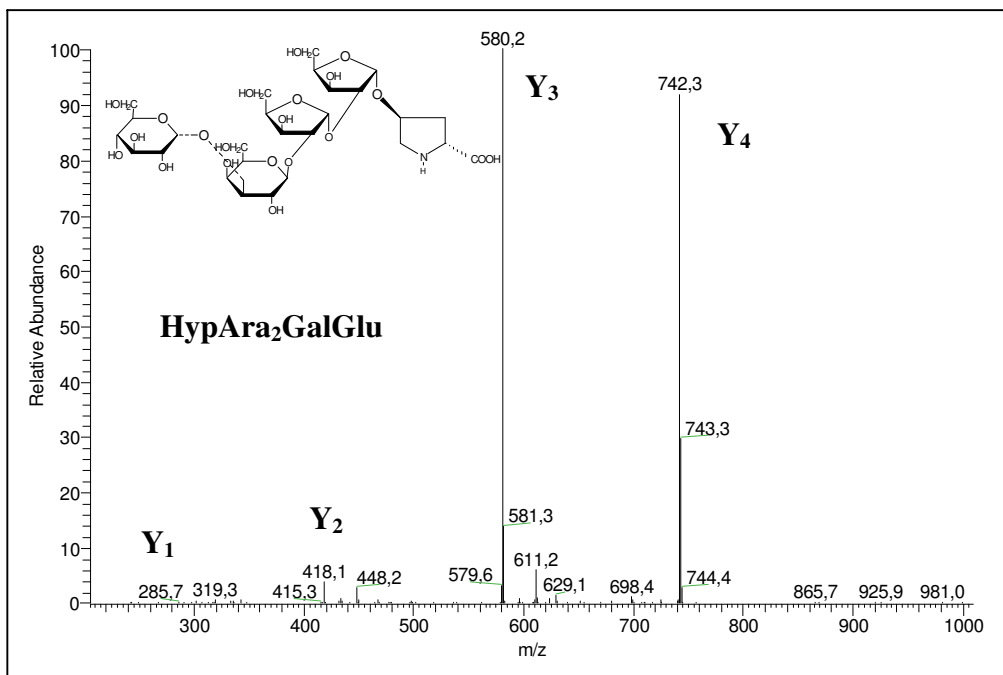


Abb. 120: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum von HypAra<sub>2</sub>GalGlu Aminex-Fraktion 4.

## 5.2 Methylierungsanalyse Hydroxyprolin gebundener Glykane

### 5.2.1 EI-Spektren der Cis-Hydroxyprolin gebundenen Glykane aus *Arabidopsis thaliana*

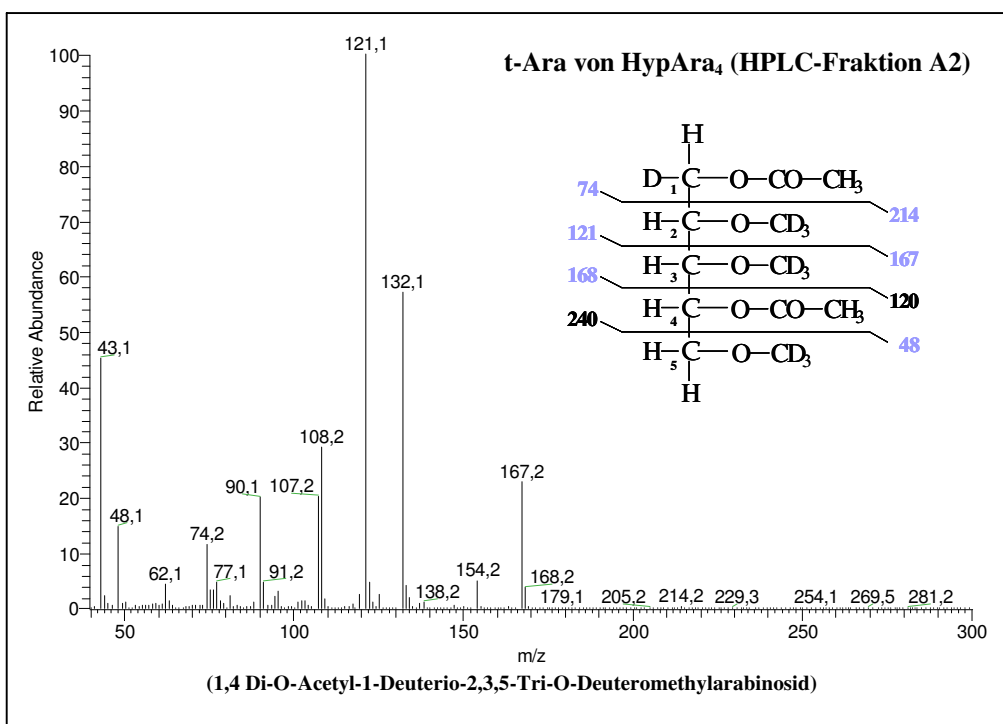
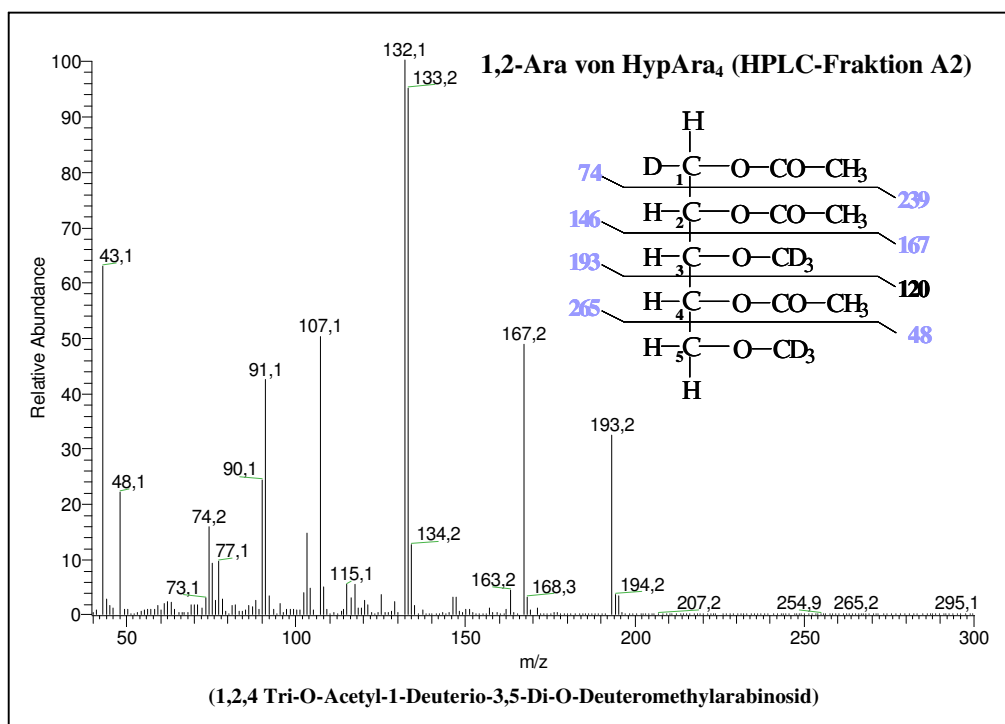
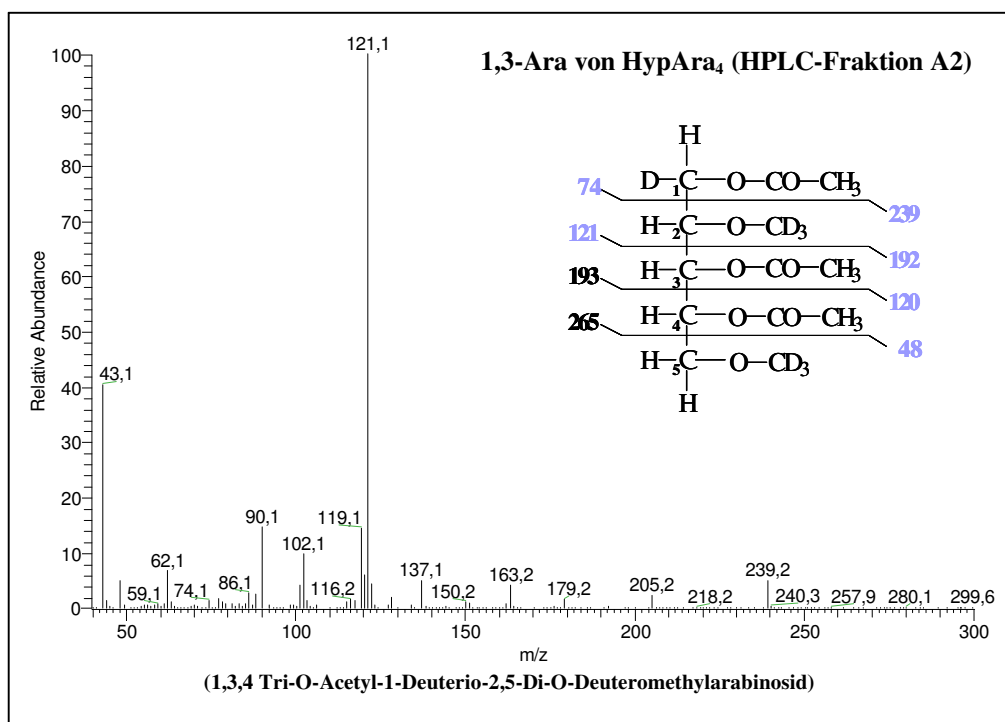


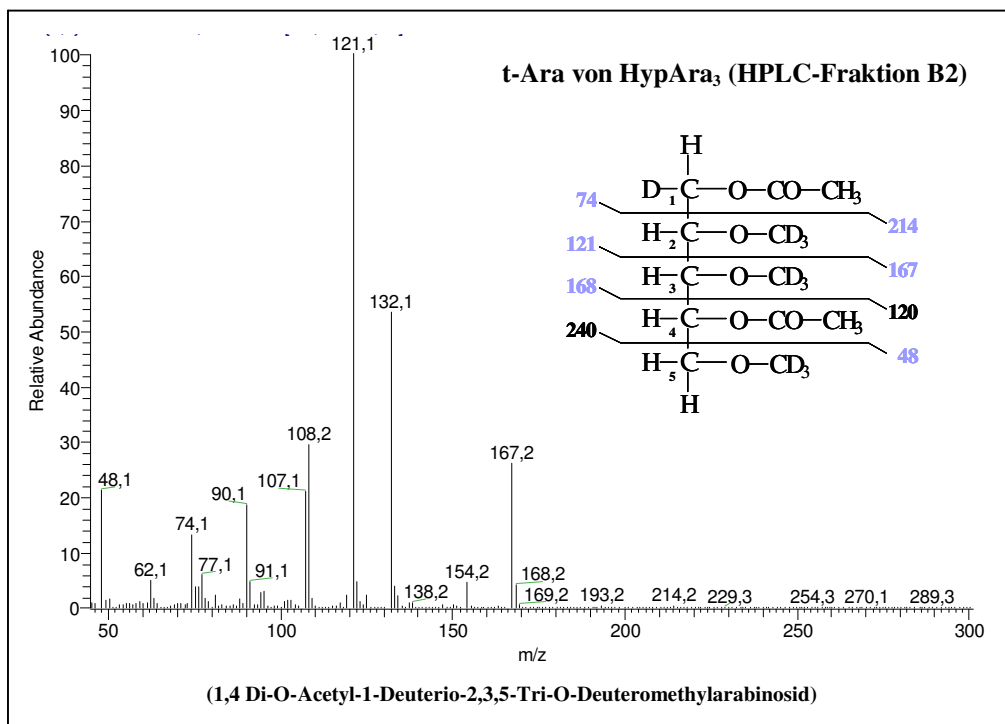
Abb. 121: EI-Fragmentierung des Derivates der terminalen Arabinose von HypAra<sub>4</sub> aus HPLC-Fraktion A2.



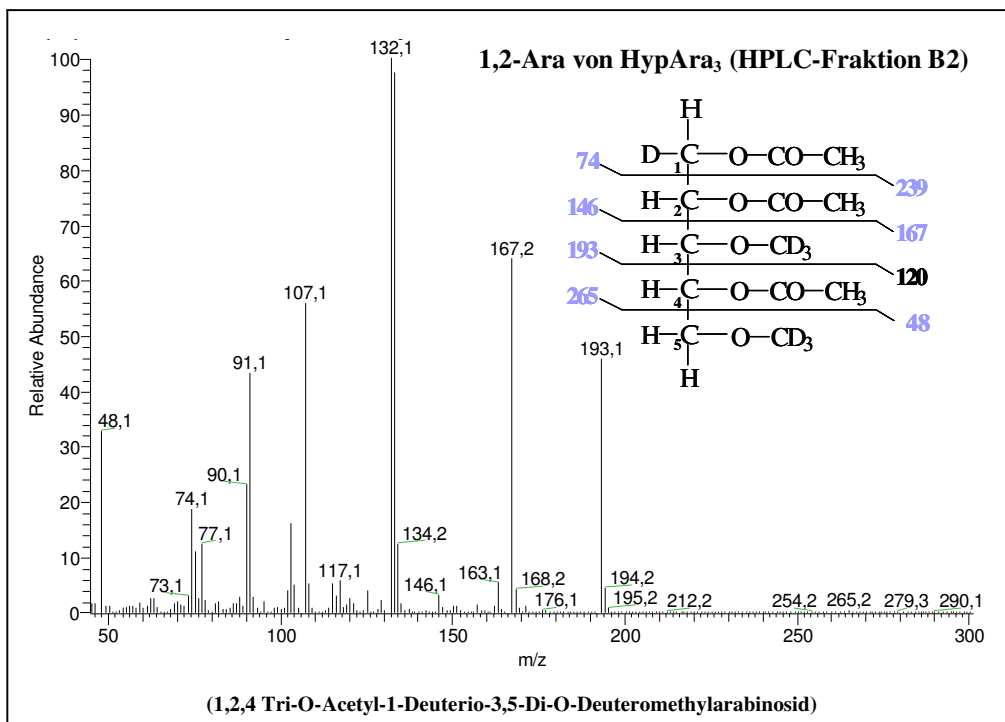
**Abb. 122:** EI-Fragmentierung des Derivates der 1,2 verbundenen Arabinose von HypAra<sub>4</sub> aus HPLC-Fraktion A2.



**Abb. 123:** EI-Fragmentierung des Derivates der 1,3 verbundenen Arabinose von HypAra<sub>4</sub> aus HPLC-Fraktion A2.



**Abb. 124:** EI-Fragmentierung des Derivates der terminalen Arabinose von HypAra<sub>3</sub> aus HPLC-Fraktion B2.



**Abb. 125:** EI-Fragmentierung des Derivates der 1,2 verbundenen Arabinose von HypAra<sub>4</sub> aus HPLC-Fraktion B2.



## 5.2.2 GC-MS-Analyse der HypGlykane aus *Chlamydomonas reinhardtii*

(Dargestellt sind die Analysen der Aminex-Fractionen 1-8 aus Kapitel 2.3)

### 5.2.2.1 Gaschromatogramme

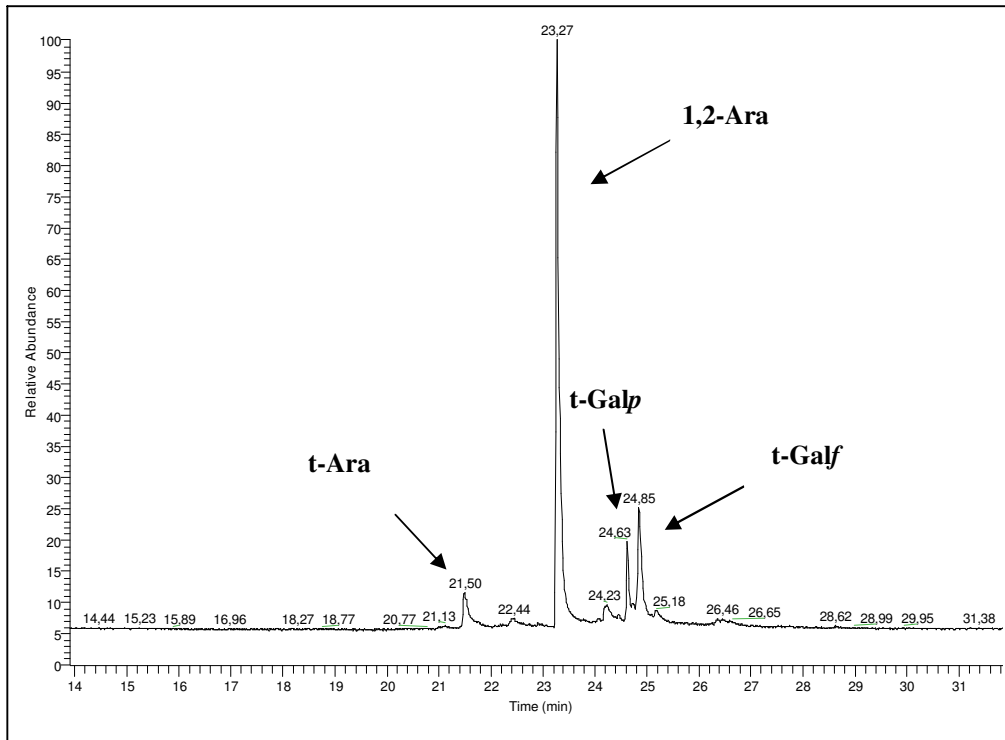


Abb. 126: Gaschromatogramm zur Methylierungsanalyse von Aminex Fraktion 8.

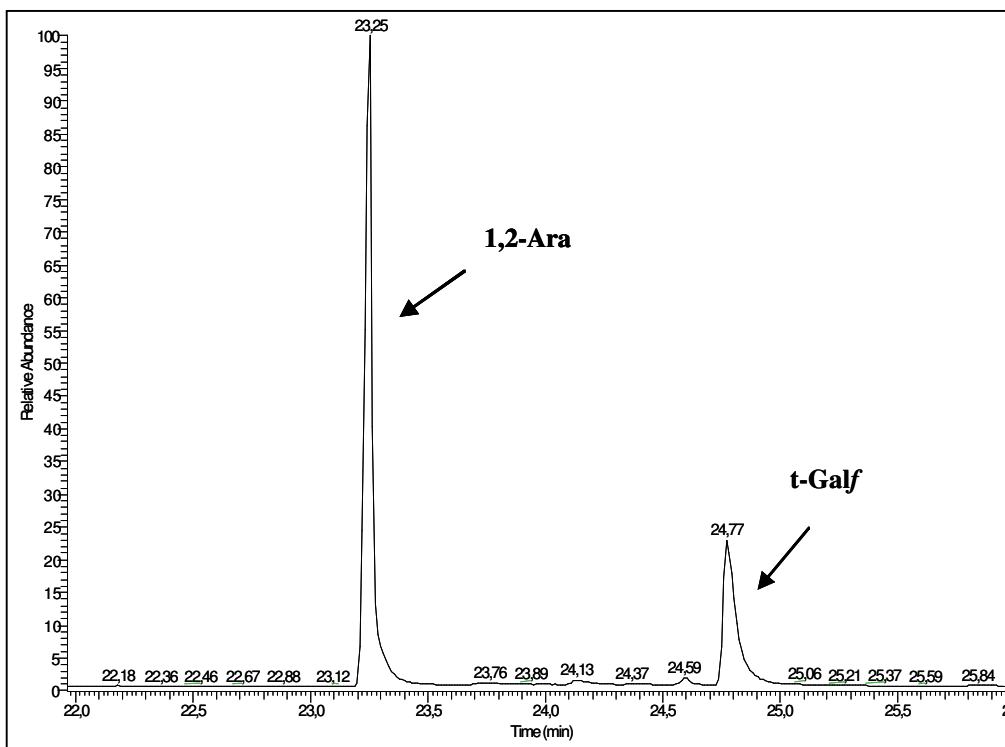


Abb. 127: Gaschromatogramm zur Methylierungsanalyse von Aminex Fraktion 7.

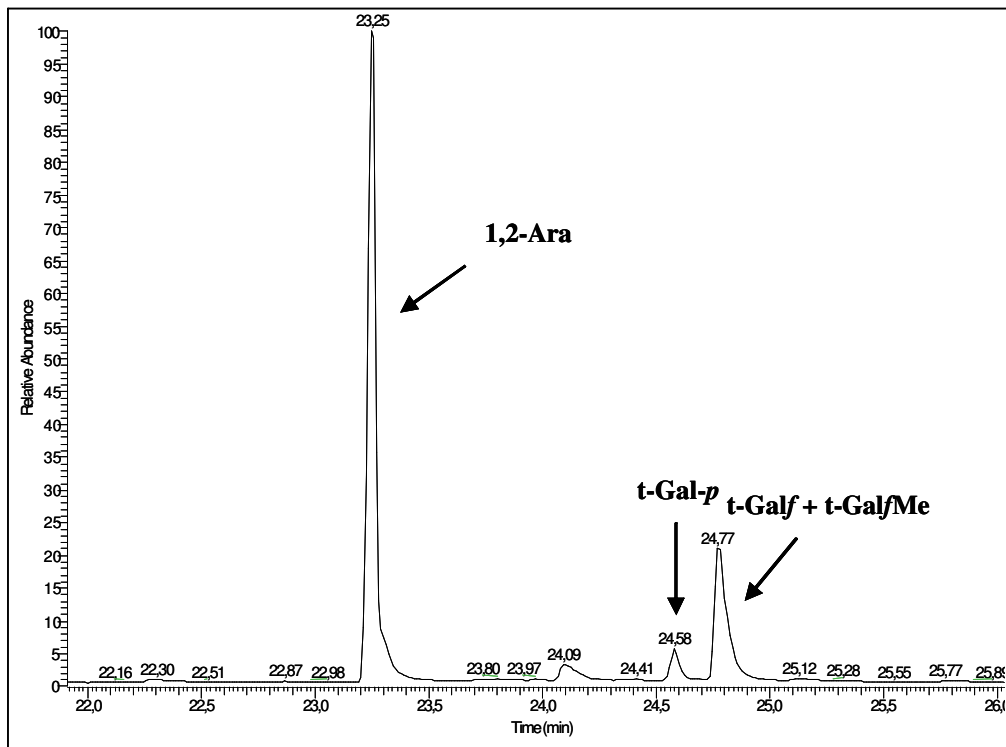


Abb. 128: Gaschromatogramm zur Methylierungsanalyse von Aminex Fraktion 6.

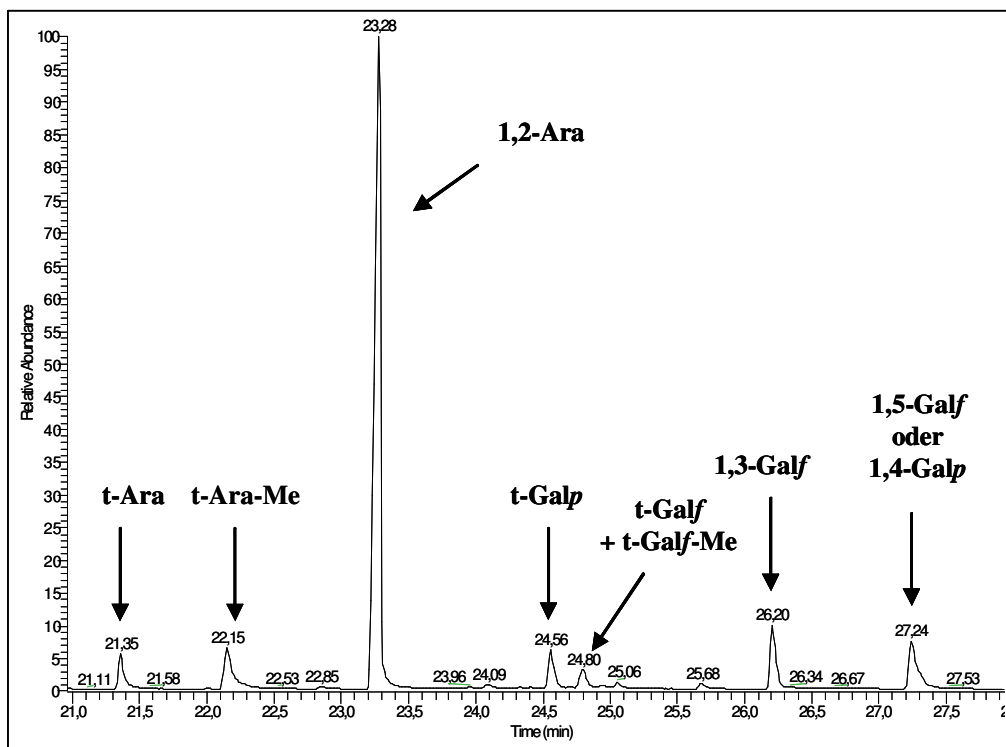


Abb. 129: Gaschromatogramm zur Methylierungsanalyse von Aminex Fraktion 5.

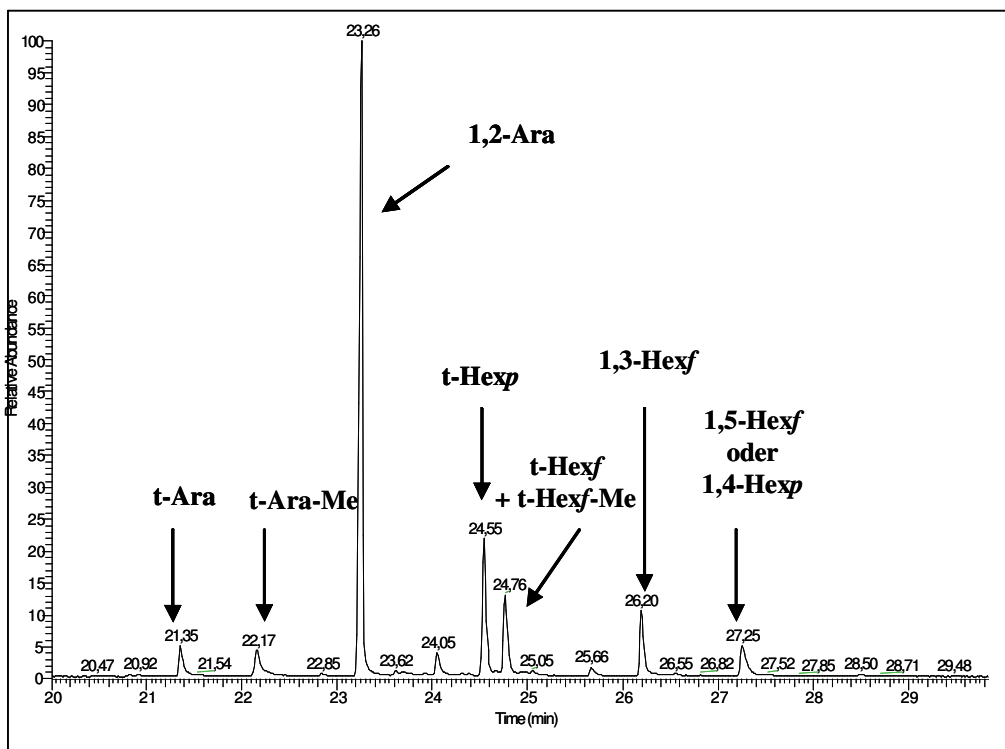


Abb. 130: Gaschromatogramm zur Methylierungsanalyse von Aminex Fraktion 4.

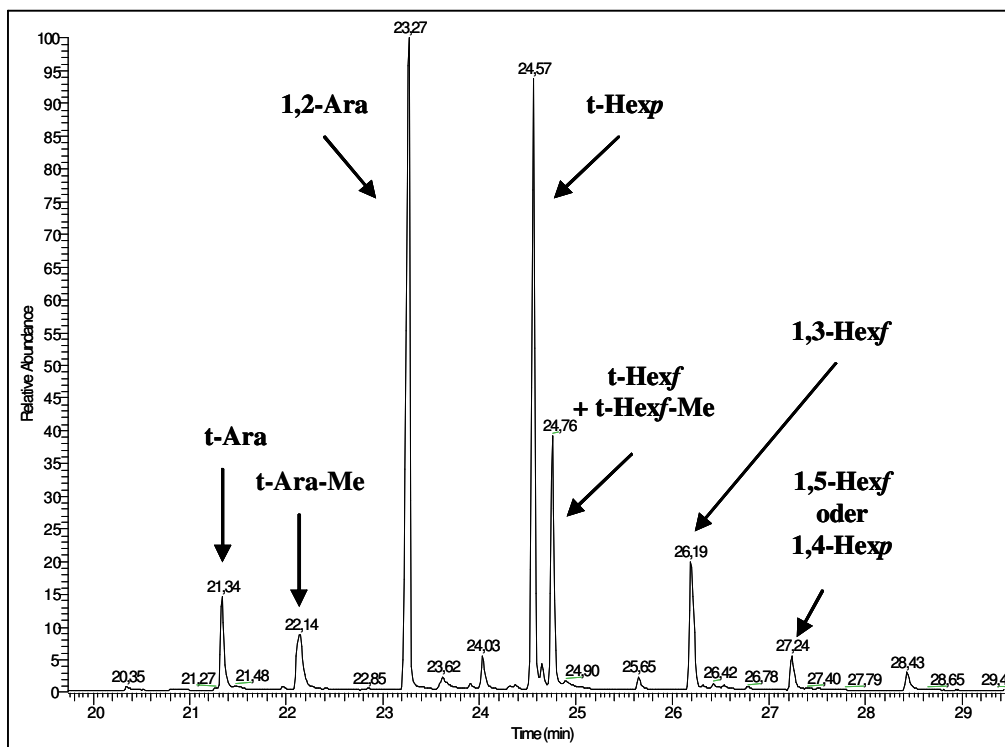


Abb. 131: Gaschromatogramm zur Methylierungsanalyse von Aminex Fraktion 3.

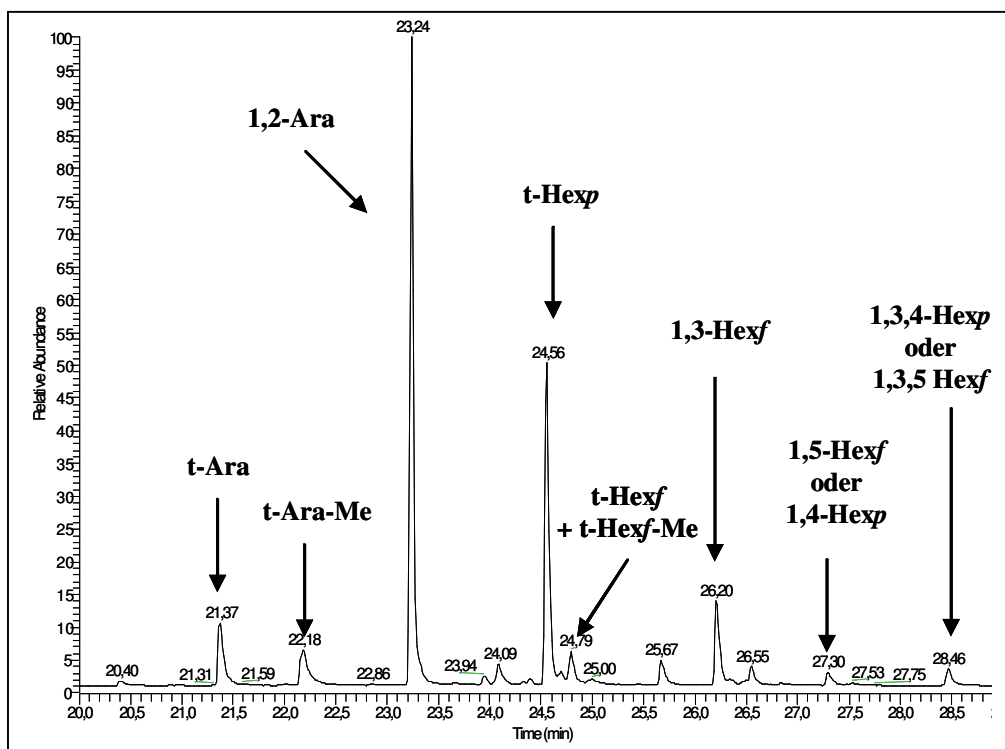


Abb. 132: Gaschromatogramm zur Methylierungsanalyse von Aminex Fraktion 2.

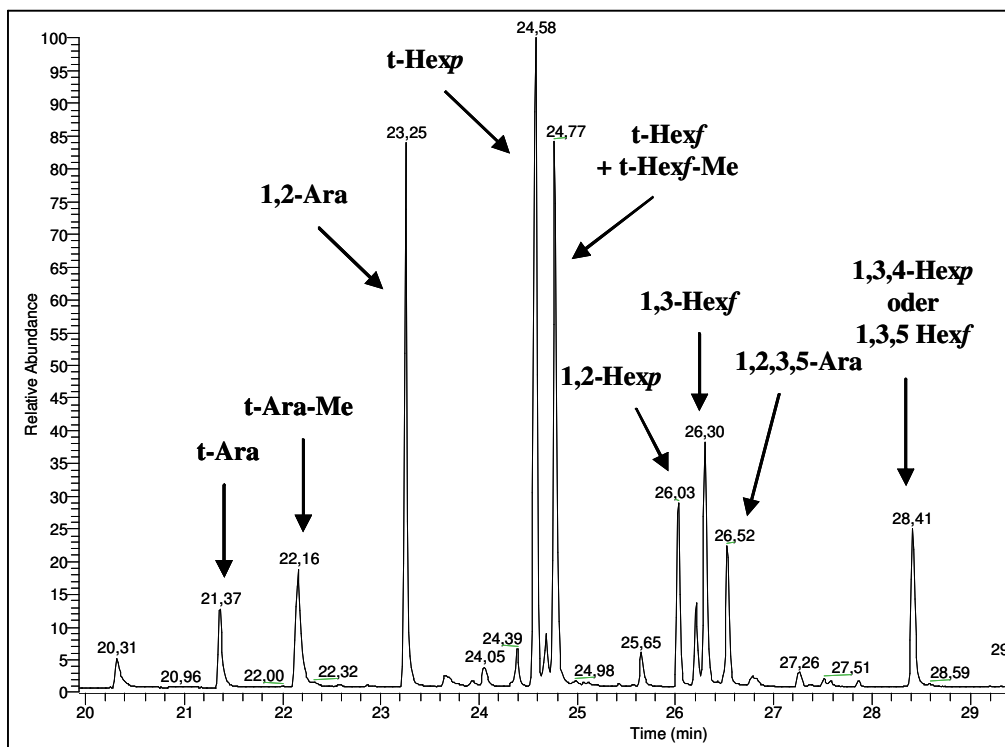
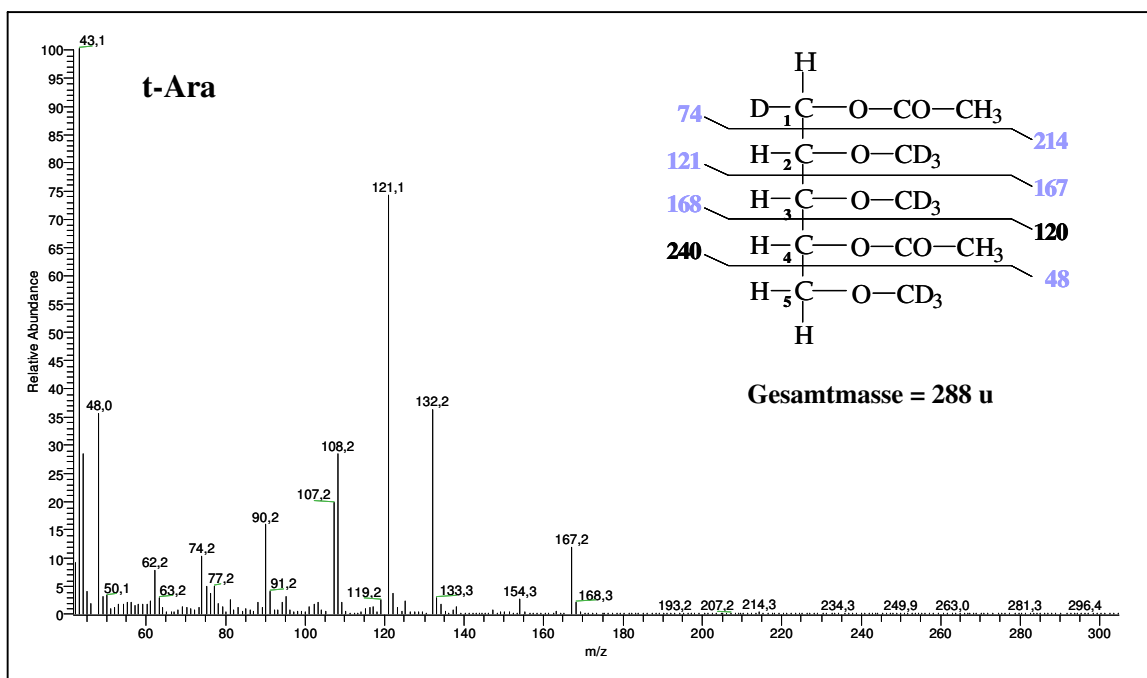


Abb. 133: Gaschromatogramm zur Methylierungsanalyse von Aminex Fraktion 1.

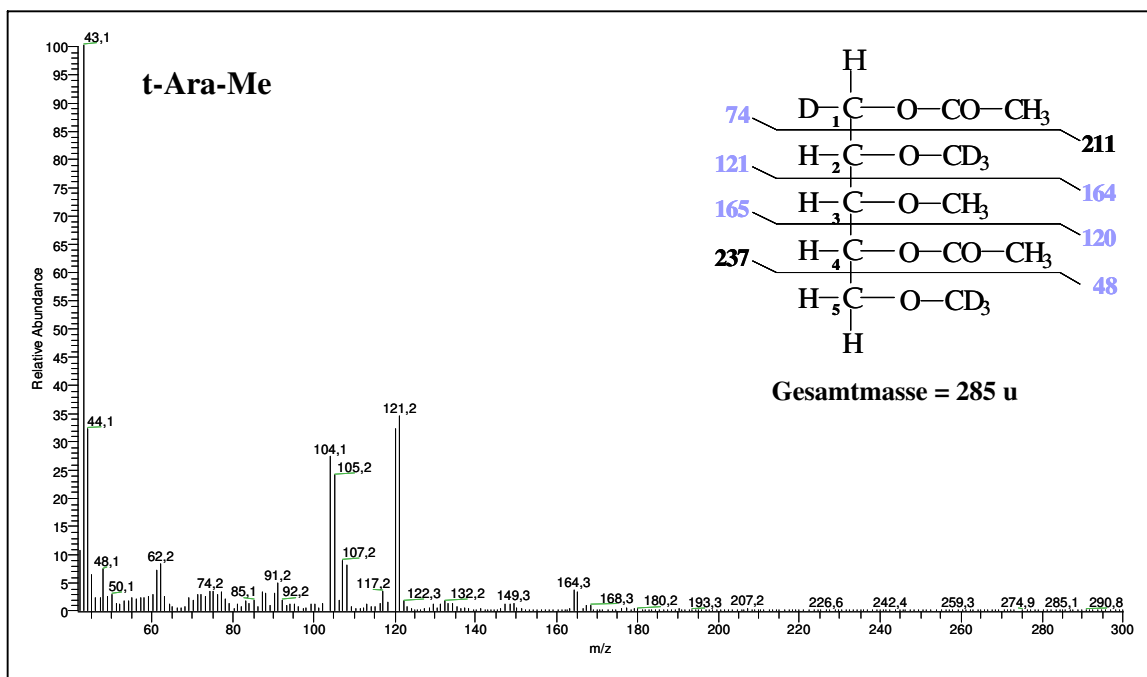
### 5.2.2.2 EI-Spektren identifizierter Zuckermonomere



**Abb. 134:** EI-Spektrum perdeuteromethylierter, acetylierter, terminaler Arabinose.  
Retentionszeit = 21,50 min in Fraktion 8.

**Tabelle 29:** Theoretische und beobachtete Fragmentionen bei der EI-Fragmentierung derivatisierter terminaler Arabinose. Angegeben sind die m/z-Verhältnisse der Ionen.

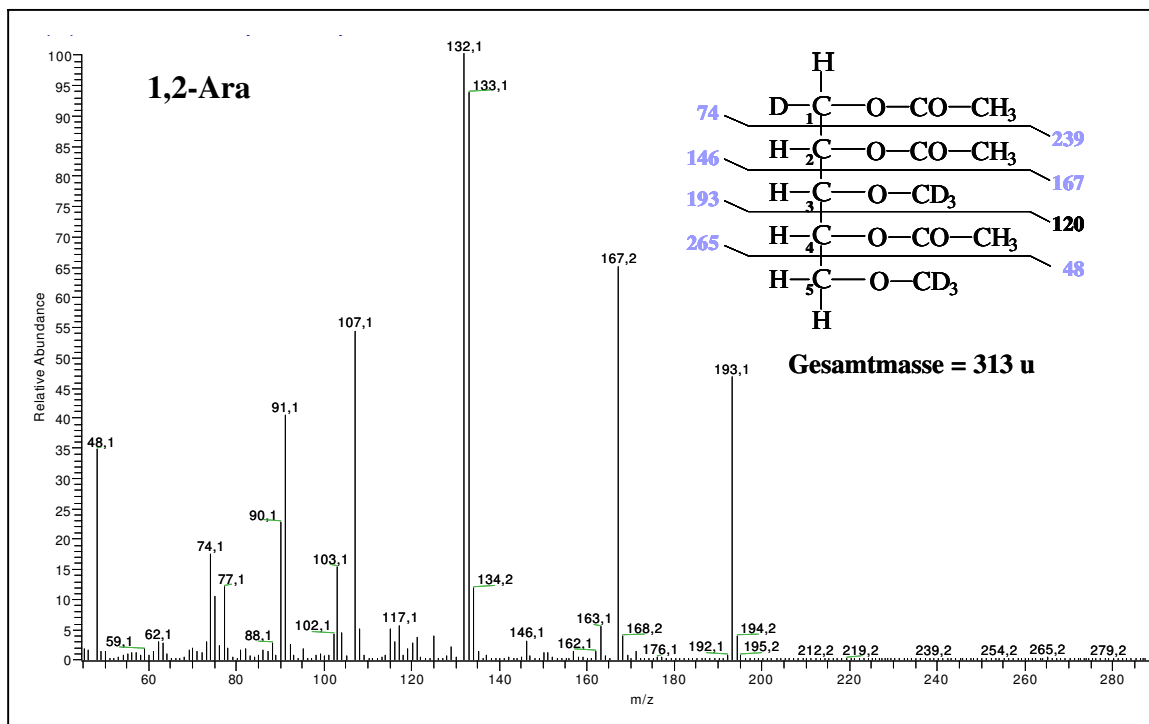
Bindungsbruch unterhalb von Kettenposition Position	Hauptfragmentionen	McLafferty-Fragmentionen			
		Umlagerung nach oben		Umlagerung nach unten	
		Spaltung vor O	Spaltung nach O	Spaltung vor O	Spaltung nach O
<b>C<sub>1</sub></b>	74	108	92	273	257
	214	180	196	15	31
<b>C<sub>2</sub></b>	121	155	139	201	185
	167	133	149	87	103
<b>C<sub>3</sub></b>	168	227	211	154	138
	120	61	77	134	146
<b>C<sub>4</sub></b>	240	274	258	107	91
	48	14	30	181	197



**Abb. 135:** EI-Spektrum perdeuteromethylierter, acetylierter, terminaler  $C_3$ -methylierter Arabinose. Retentionszeit = 22,15 min, Fraktion 5.

**Tabelle 30:** Theoretische und beobachtete Fragmentionen bei der EI-Fragmentierung derivatisierter, terminaler  $C_3$ -methylierter Arabinose. Angegeben sind die  $m/z$ -Verhältnisse der Ionen.

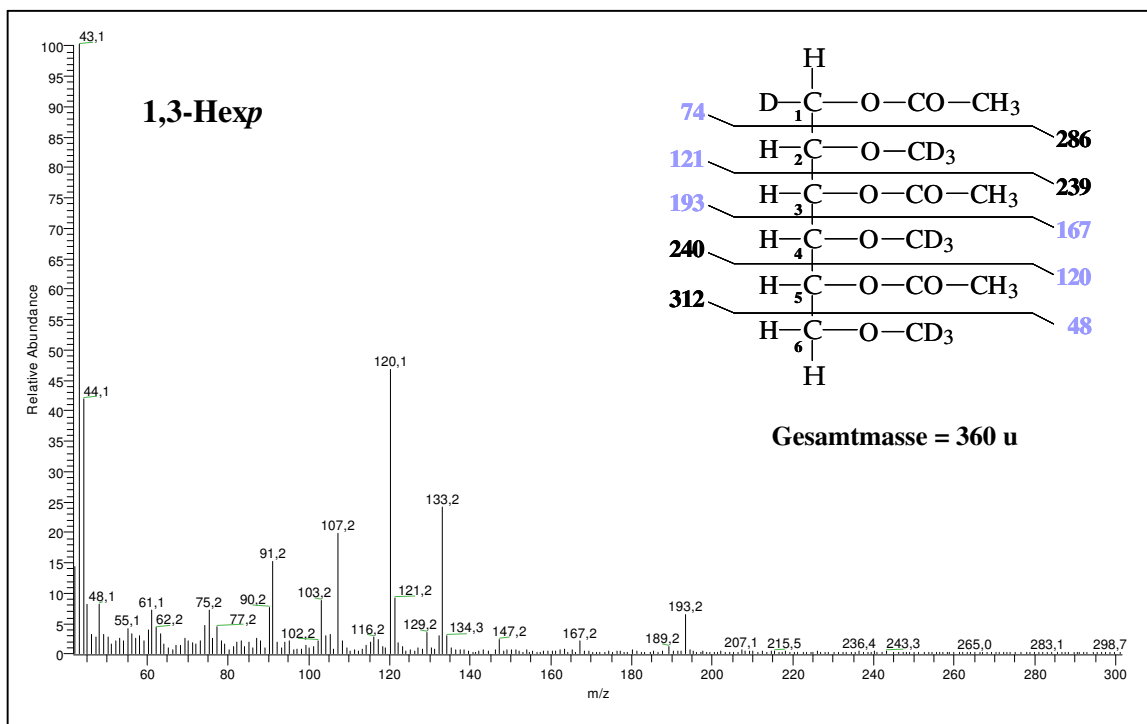
Bindungsbruch unterhalb von Kettenposition Position	Hauptfragmentationen	McLafferty-Fragmentionen			
		Umlagerung nach oben		Umlagerung nach unten	
		Spaltung vor O	Spaltung nach O	Spaltung vor O	Spaltung nach O
$C_1$	74	108	92	270	254
	211	177	193	15	31
$C_2$	121	155	139	198	182
	164	130	146	87	103
$C_3$	165	224	207	151	135
	120	61	78	134	150
$C_4$	237	271	255	107	91
	48	14	30	178	194



**Abb. 136:** EI-Spektrum perdeuteromethylierter, acetylierter, 1,2 verbundener Arabinose.  
Retentionszeit = 23,27 min in Fraktion 8.

**Tabelle 31:** Theoretische und beobachtete Fragmentionen bei der EI-Fragmentierung derivatisierter 1,2 verbundener Arabinose. Angegeben sind die m/z-Verhältnisse der Ionen.

Bindungsbruch unterhalb von Kettenposition Position	Hauptfragmentionen	McLafferty-Fragmentionen			
		Umlagerung nach oben		Umlagerung nach unten	
		Spaltung vor O	Spaltung nach O	Spaltung vor O	Spaltung nach O
<b>C<sub>1</sub></b>	74	133	117	298	282
	239	180	196	15	31
<b>C<sub>2</sub></b>	146	180	164	226	210
	167	133	149	87	103
<b>C<sub>3</sub></b>	193	252	236	154	138
	120	61	77	159	175
<b>C<sub>4</sub></b>	265	299	283	107	91
	48	14	30	206	222

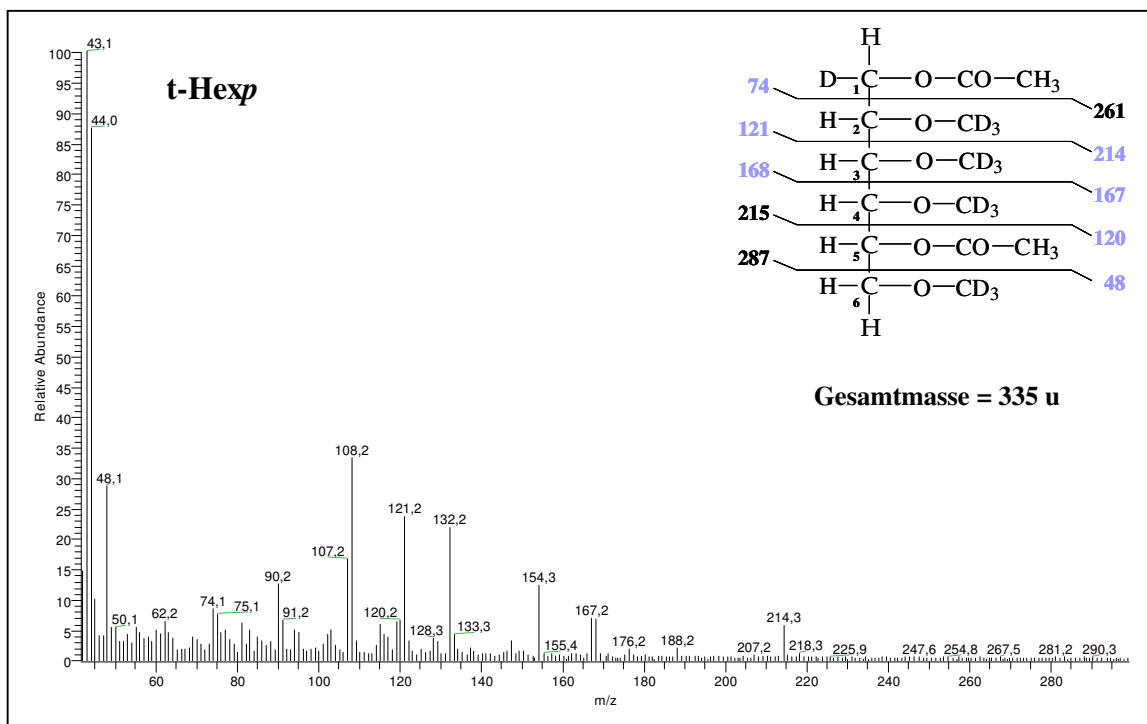


**Abb. 137:** EI-Spektrum perdeuteromethylierter, acetylierter, 1,3 verbundener Hexopyranose.  
Retentionszeit = 24,05 min in Aminex-Fraktion 4.

**Tabelle 32:** Theoretische und beobachtete Fragmentionen bei der EI-Fragmentierung derivatisierter 1,3 verbundener Hexopyranose. Angegeben sind die  $m/z$ -Verhältnisse der Ionen.

Bindungsbruch unterhalb von Kettenposition Position	Hauptfragmentionen	McLafferty-Fragmentionen			
		Umlagerung nach oben		Umlagerung nach unten	
		Spaltung vor O	Spaltung nach O	Spaltung vor O	Spaltung nach O
$C_1$	74	108	92	345	329
	286	252	268	15	31
$C_2$	121	180	164	273	257
	239	180	196	87	103
$C_3$	193	227	211	226	210
	167	133	149	134	150
$C_4$	240	299	283	154	138
	120	61	77	206	222
$C_5$	312	346	330	107	91
	48	14	30	253	269





**Abb. 138:** EI-Spektrum perdeuteromethylierter, acetylierter, terminaler Hexopyranose.  
Retentionszeit = 24,58 min in Fraktion 6.

**Tabelle 33:** Theoretische und beobachtete Fragmentionen bei der EI-Fragmentierung derivatisierter terminaler Hexopyranose. Angegeben sind die m/z-Verhältnisse der Ionen.

Bindungsbruch unterhalb von Kettenposition Position	Hauptfragmentionen	McLafferty-Fragmentionen			
		Umlagerung nach oben		Umlagerung nach unten	
		Spaltung vor O	Spaltung nach O	Spaltung vor O	Spaltung nach O
<b>C<sub>1</sub></b>	74	108	92	15	31
	261	227	243	320	304
<b>C<sub>2</sub></b>	121	155	139	87	103
	214	180	196	248	232
<b>C<sub>3</sub></b>	168	202	186	134	150
	167	133	149	201	185
<b>C<sub>4</sub></b>	215	274	258	181	197
	120	61	77	154	138
<b>C<sub>5</sub></b>	287	321	305	228	244
	48	18	30	107	91

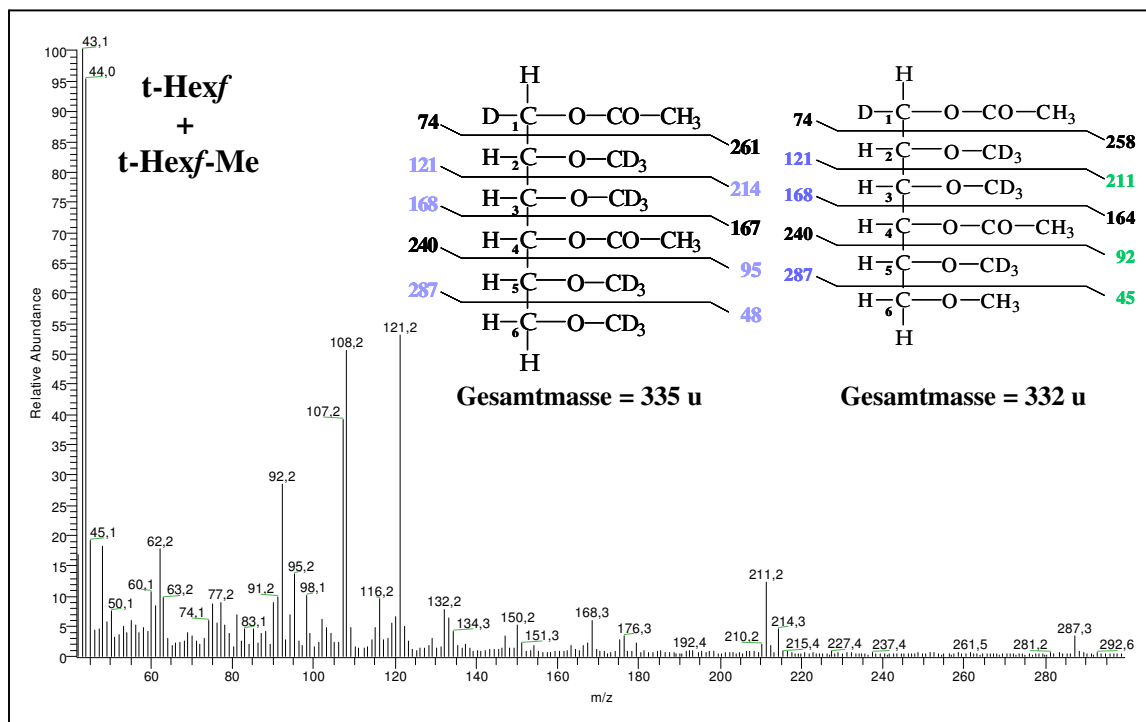
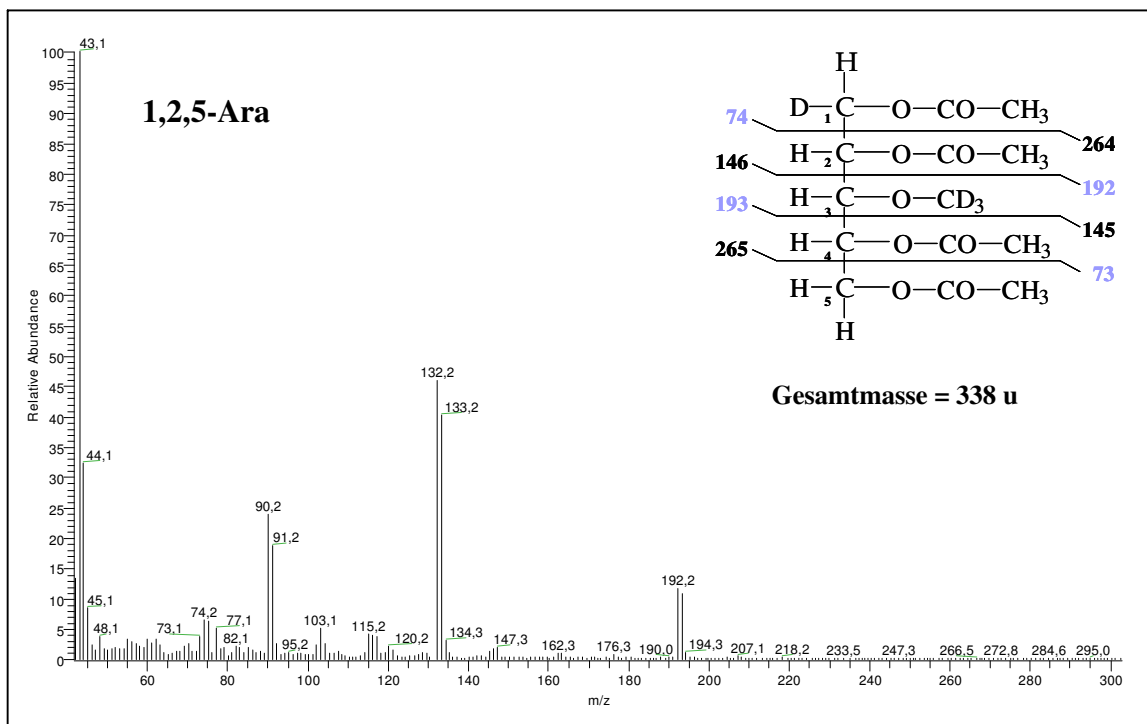


Abb. 139: EI-Spektrum perdeuteromethylierter, acetylierter, terminaler Hexofuranose und terminaler C<sub>6</sub>-methylierter Hexofuranose. Retentionszeit =24,85 min in Aminex-Fraktion 8.

Tabelle 34: Theoretische und beobachtete Fragmentationen bei der EI-Fragmentierung derivatisierter, terminaler Hexofuranose. Angegeben sind die m/z-Verhältnisse der Ionen.

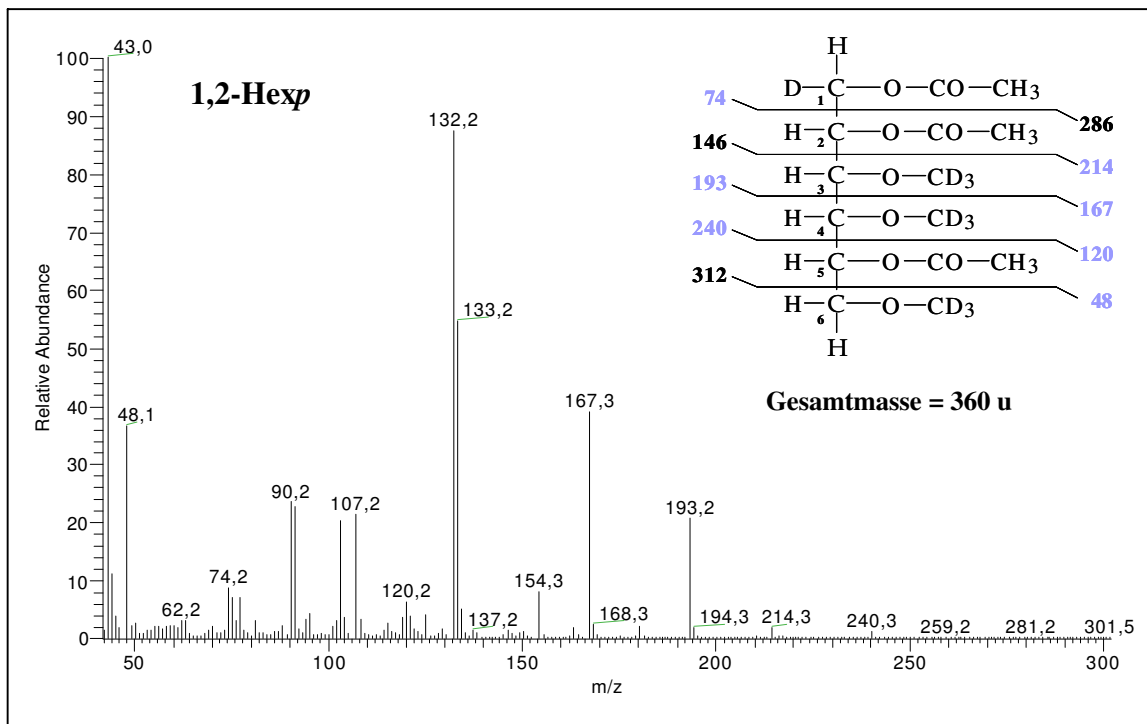
Bindungsbruch unterhalb von Kettenposition Position	Hauptfragmentationen (t-Hexf + tHexf-Me)	McLafferty-Fragmentationen (t-Hexf)			
		Umlagerung nach oben		Umlagerung nach unten	
		Spaltung vor O	Spaltung nach O	Spaltung vor O	Spaltung nach O
C <sub>1</sub>	74	108	92	320	304
	261	227	243	15	31
C <sub>2</sub>	121	155	139	248	232
	214 (211)	180	196	87	103
C <sub>3</sub>	168	227	211	201	185
	167	108	124	134	150
C <sub>4</sub>	240	274	258	154	197
	95 (92)	61	77	181	138
C <sub>5</sub>	287	321	305	253	269
	48 (45)	14	30	82	66



**Abb. 140:** EI-Spektrum perdeuteromethylierter, acetylierter, 1,2,5 verbundener Arabinose.  
Retentionszeit = 25,67 min in Fraktion 3.

**Tabelle 35:** Theoretische und beobachtete Fragmentionen bei der EI-Fragmentierung derivatisierter 1,2,5 verbundener Arabinose. Angegeben sind die m/z-Verhältnisse der Ionen.

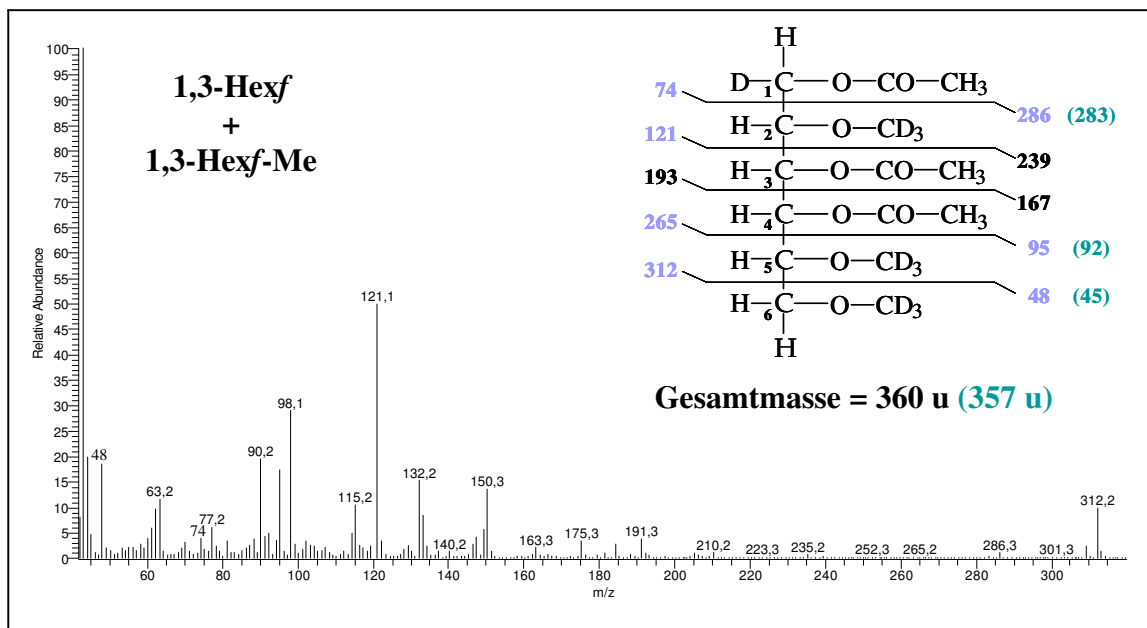
Bindungsbruch unterhalb von Kettenposition Position	Hauptfragmentionen	McLafferty-Fragmentionen			
		Umlagerung nach oben		Umlagerung nach unten	
		Spaltung vor O	Spaltung nach O	Spaltung vor O	Spaltung nach O
<b>C<sub>1</sub></b>	74	133	117	323	307
	264	205	221	15	31
<b>C<sub>2</sub></b>	146	180	164	251	235
	192	158	174	87	103
<b>C<sub>3</sub></b>	193	252	236	179	163
	145	86	102	159	165
<b>C<sub>4</sub></b>	265	324	308	132	116
	73	14	30	206	222



**Abb. 141:** EI-Spektrum perdeuteromethylierter, acetylierter, 1,2 verbundener Hexopyranose. Retentionszeit = 26,03 min in Aminex-Fraktion 1.

**Tabelle 36:** Theoretische und beobachtete Fragmentionen bei der EI-Fragmentierung derivatisierter 1,2,5 verbundener Arabinose. Angegeben sind die m/z-Verhältnisse der Ionen.

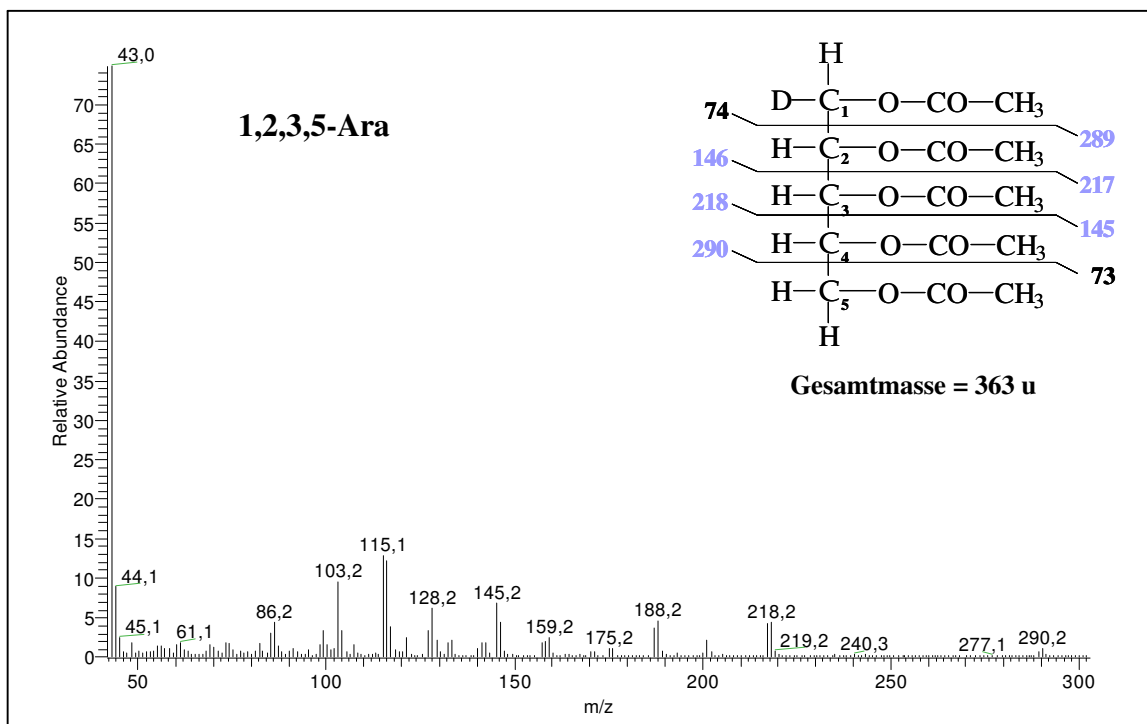
Bindungsbruch unterhalb von Kettenposition Position	Hauptfragmentationen	McLafferty-Fragmentationen			
		Umlagerung nach oben		Umlagerung nach unten	
		Spaltung vor O	Spaltung nach O	Spaltung vor O	Spaltung nach O
C <sub>1</sub>	74	133	117	345	329
	286	227	243	15	31
C <sub>2</sub>	146	180	164	273	257
	214	180	196	87	103
C <sub>3</sub>	193	227	211	201	185
	167	133	149	159	175
C <sub>4</sub>	240	299	283	154	138
	120	61	77	206	222
C <sub>5</sub>	312	346	330	107	91
	48	14	30	253	269



**Abb. 142:** EI-Spektrum perdeuteromethylierter, acetylierter, 1,3 verbundener Hexofuanose und C<sub>6</sub>-methylierter 1,3 verbundener Hexofuranose.  
Retentionszeit = 26,20 min in Aminex-Fraktion 5.

**Tabelle 37:** Theoretische und beobachtete Fragmentionen bei der EI-Fragmentierung derivatisierter, 1,3 verbundener Hexofuranose. Angegeben sind die m/z-Verhältnisse der Ionen.

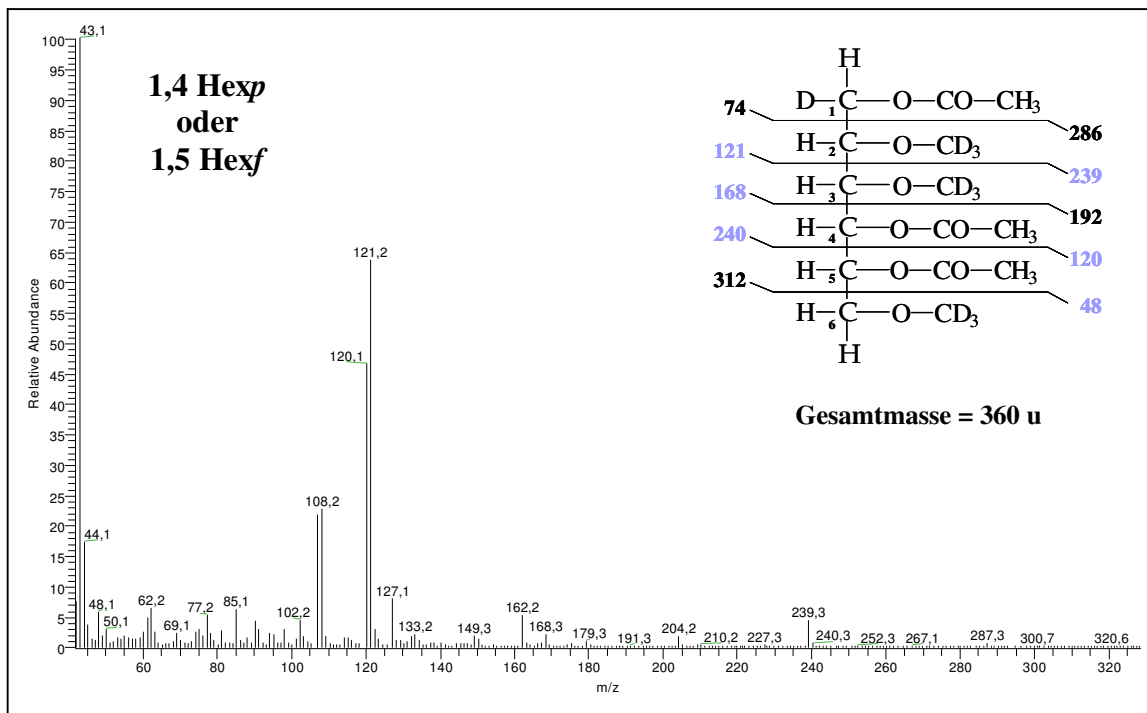
Bindungsbruch unterhalb von Kettenposition Position	Hauptfragmentationen 1,3 Hexf und 1,3 Hexf-Me	McLafferty-Fragmentationen (1,3 Hexf)			
		Umlagerung nach oben		Umlagerung nach unten	
		Spaltung vor O	Spaltung nach O	Spaltung vor O	Spaltung nach O
C <sub>1</sub>	74	108	92	345	329
	286 (283)	252	268	15	31
C <sub>2</sub>	121	180	164	273	257
	239	180	196	87	103
C <sub>3</sub>	193	252	236	226	210
	167	108	124	134	150
C <sub>4</sub>	265	299	283	154	138
	95 (92)	61	77	206	222
C <sub>5</sub>	312	346	330	82	66
	48 (45)	14	30	278	294



**Abb. 143:** EI-Spektrum perdeuteromethylierter, acetylierter, 1,2,3,5 verbundener Arabinose. blau Retentionszeit = 26,51 min in Aminex-Fraktion 1.

**Tabelle 38:** Theoretische und beobachtete Fragmentionen bei der EI-Fragmentierung derivatisierter 1,2,3,5 verbundener Arabinose. Angegeben sind die m/z-Verhältnisse der Ionen.

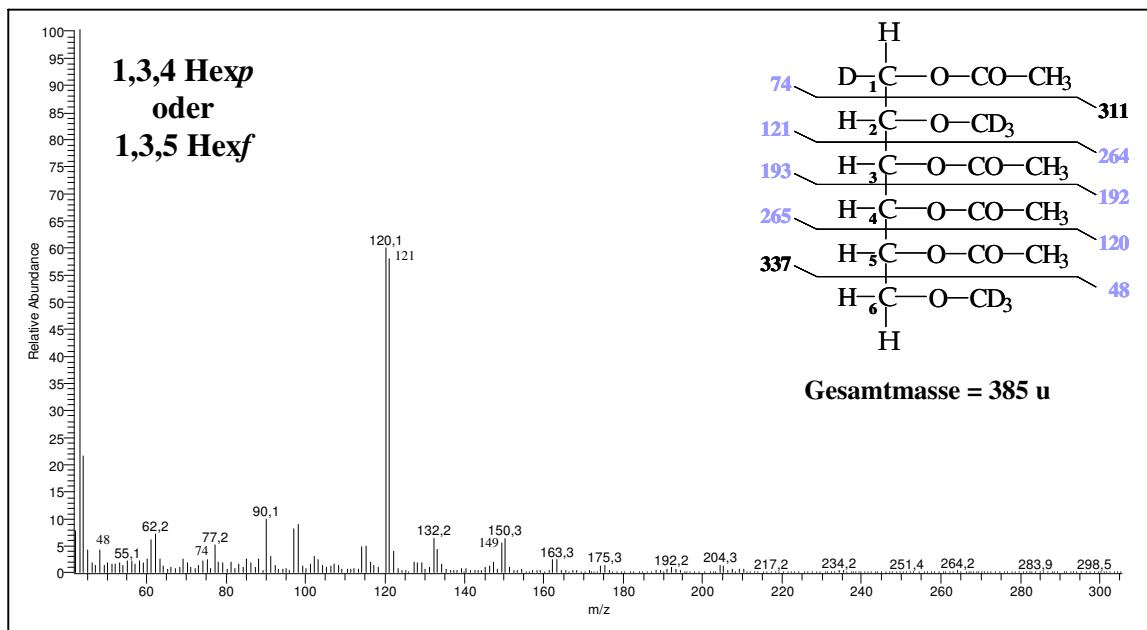
Bindungsbruch unterhalb von Kettenposition Position	Hauptfragmentionen	McLafferty-Fragmentionen			
		Umlagerung nach oben		Umlagerung nach unten	
		Spaltung vor O	Spaltung nach O	Spaltung vor O	Spaltung nach O
<b>C<sub>1</sub></b>	74	133	117	348	332
	289	230	246	15	31
<b>C<sub>2</sub></b>	146	205	189	276	260
	217	158	174	87	103
<b>C<sub>3</sub></b>	218	277	261	204	188
	145	86	102	159	175
<b>C<sub>4</sub></b>	290	349	333	132	116
	73	14	30	231	247



**Abb. 144:** EI-Spektrum perdeuteromethylierter, acetylierter, terminaler 1,4 verbundener Hexopyranose oder 1,5 verbundener Hexofuranose. Retentionszeit = 27,25 min in Fraktion 4.

**Tabelle 39:** Theoretische und beobachtete Fragmentionen bei der EI-Fragmentierung derivatisierter 1,4 verbundener Hexopyranose oder 1,5 verbundener Hexofuranose.

Bindungsbruch unterhalb von Kettenposition Position	Hauptfragmentionen	McLafferty-Fragmentionen			
		Umlagerung nach oben		Umlagerung nach unten	
		Spaltung vor O	Spaltung nach O	Spaltung vor O	Spaltung nach O
<b>C<sub>1</sub></b>	74	108	92	345	329
	286	252	268	15	31
<b>C<sub>2</sub></b>	121	155	139	273	257
	239	205	221	87	103
<b>C<sub>3</sub></b>	168	227	211	226	210
	192	133	149	134	150
<b>C<sub>4</sub></b>	240	299	283	169	163
	120	61	77	191	197
<b>C<sub>5</sub></b>	312	346	330	107	91
	48	14	30	253	269



**Abb. 145:** EI-Spektrum perdeuteromethylierter, acetylierter, terminaler 1,3,4 verbundener Hexopyranose oder 1,3,5 verbundener Hexofuranose. Retentionszeit = 28,41 min in Aminex-Fraktion 1.

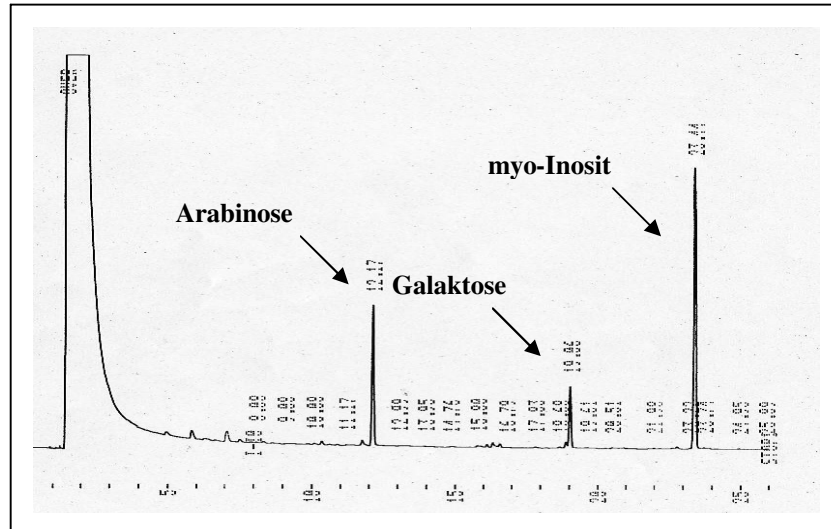
**Tabelle 40:** Theoretische und beobachtete Fragmentionen bei der EI-Fragmentierung derivatisierter 1,3,4 verbundener Hexopyranose oder 1,3,5 verbundener Hexofuranose.

Bindungsbruch unterhalb von Kettenposition Position	Hauptfragmentionen	McLafferty-Fragmentionen			
		Umlagerung nach oben		Umlagerung nach unten	
		Spaltung vor O	Spaltung nach O	Spaltung vor O	Spaltung nach O
C <sub>1</sub>	74	108	92	370	254
	311	277	293	15	31
C <sub>2</sub>	121	180	164	298	282
	264	205	221	87	103
C <sub>3</sub>	193	252	236	251	235
	192	133	149	134	150
C <sub>4</sub>	265	324	307	179	163
	120	61	78	206	222
C <sub>5</sub>	337	371	355	107	91
	48	14	30	278	294

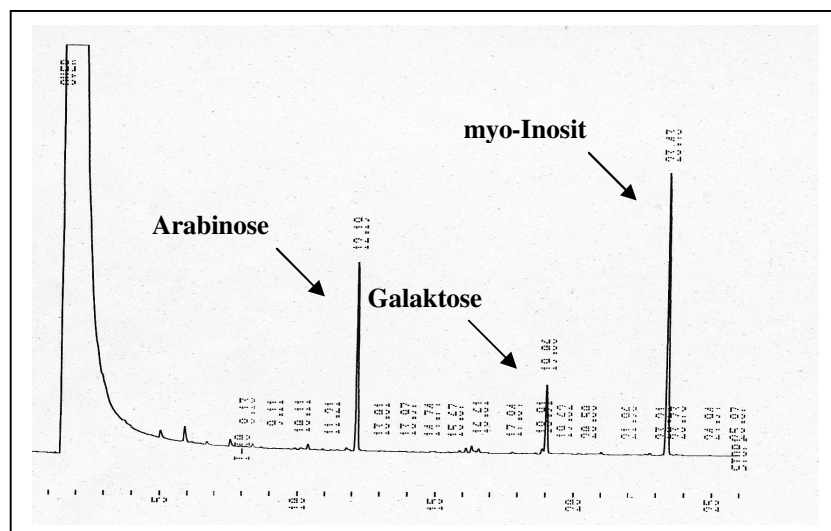


## 5.3 Sonstige Datenanhänge

### 5.3.1 GC-Analyse der Reinfractionen aus Kapitel 2.2

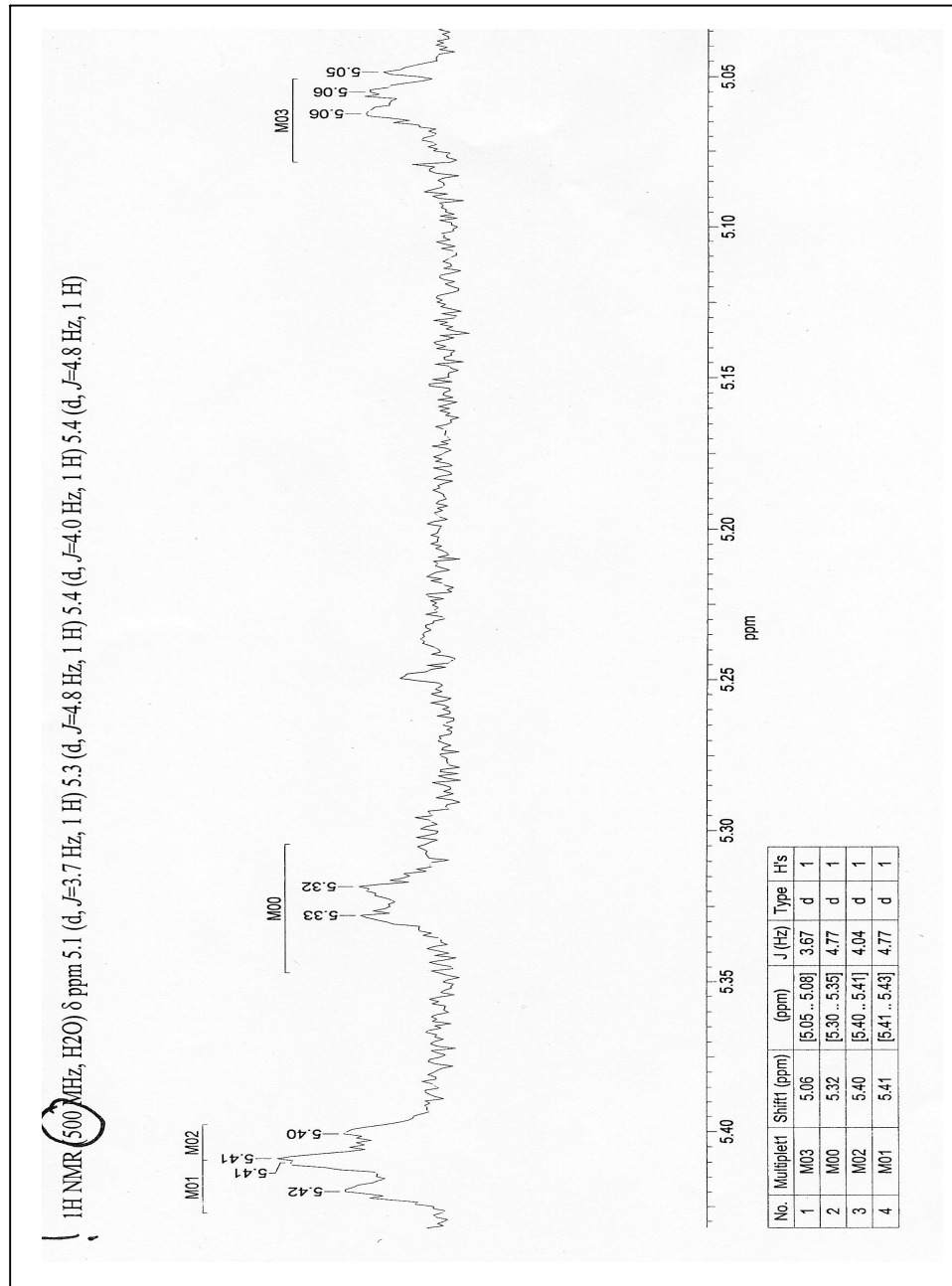


**Abb. 146:** GC-Analyse nach saurer Hydrolyse des HypGlykans einer Masse von 571 u. Zu sehen sind die Signale der Derivate von Arabinose und Galaktose im Verhältnis 2:1 neben dem internen Standard.

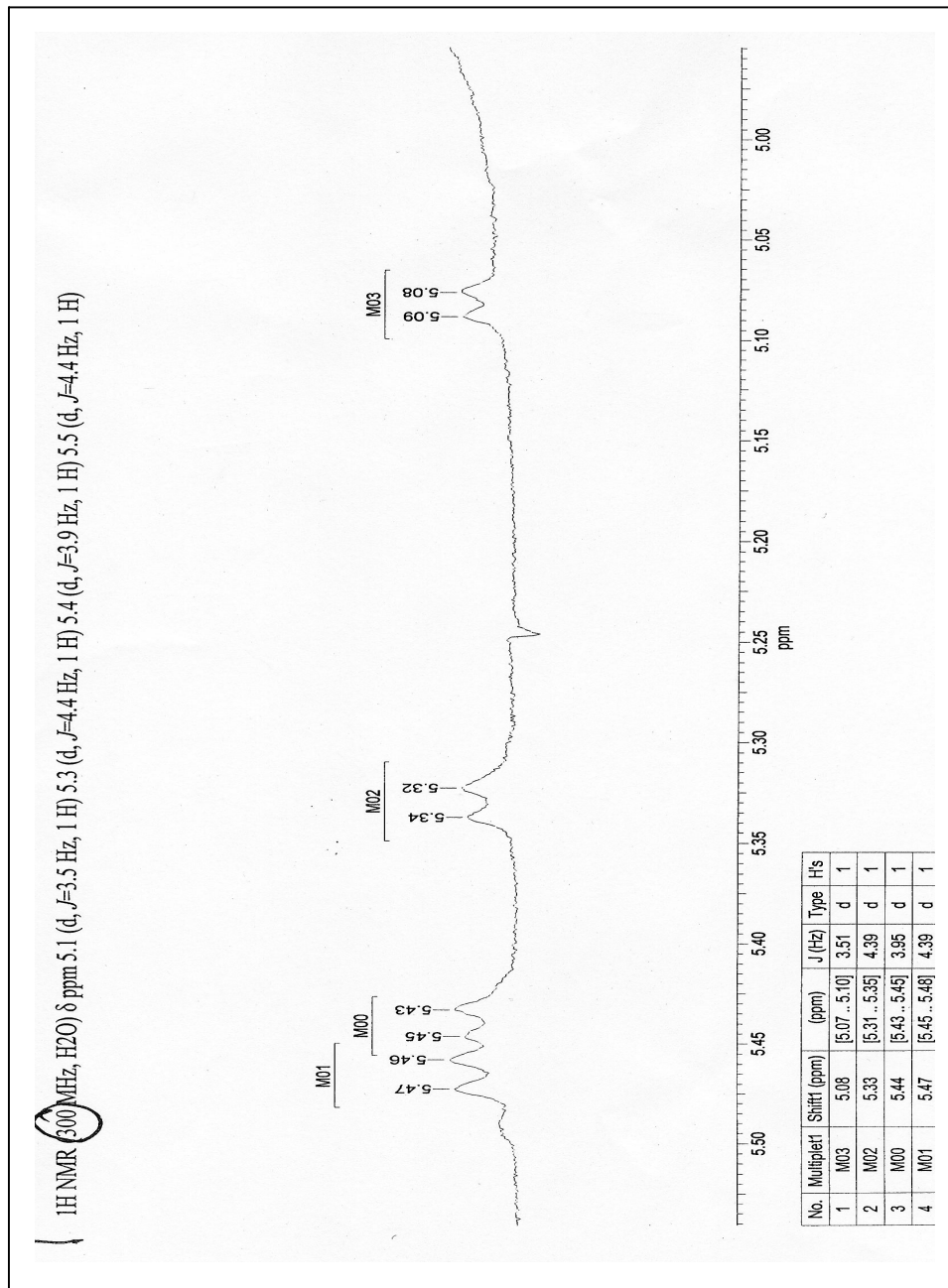


**Abb. 147:** GC-Analyse nach saurer Hydrolyse des HypGlykans einer Masse von 703 u. Zu sehen sind die Signale der Derivate von Arabinose und Galaktose im Verhältnis 3:1 neben dem internen Standard.

### 5.3.2 Zusätzliche NMR-Analysen



**Abb.148:** <sup>1</sup>H-Resonanzen des HypGlykans einer Masse von 703 u aus HPLC-Fraktion 51 aus Kapitel 2.2. Die Messungen wurden bei 50°C durchgeführt.



**Abb.149:**  $^1\text{H}$ -Resonanzen des HypGlykans einer Masse von 703 u aus HPLC-Fraktion 38 aus Kapitel 2.2. Die Messungen wurden bei 50°C durchgeführt.

## 6 Verzeichnisse

### 6.1 Literaturverzeichnis

- [1] MIZUNO K., HAYASHI T., BACHINGER H.P.  
*Hydroxylation-Induced stabilization of the collagen triple helix.*  
J. Biol. Chem. **278(34)**, 32373-32379 (2003)
- [2] MOGILNER I.G., RUDERMANN G., GRIGERA J.R.  
*Collagen stability, hydration and native state.*  
J. Mol. Graph. Model. **21(3)**, 209-213 (2002)
- [3] TOWE K.M.  
*Oxygen-Collagen Priority and the Early Metazoan Fossil Record.*  
Proc. Nat. Acad. Sci. **65(4)**, 781-788 (1970)
- [4] STRYER L.  
*Lehrbuch der Biochemie.*  
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford 4. Auflage (1996)
- [5] DUPREE P., SHERRIER D.J.  
*The plant Golgi apparatus.*  
Biochimica et Biophysica Acta **1404**, 259-270 (1998)
- [6] ROBERTS K.  
*Structures and the plant surface.*  
Curr. Opin. Cell Biol. **2**, 920-928 (1990)
- [7] LAMPORT D.T.A.  
*The isolation and partial characterisation of hydroxyprolin-rich glycopeptides obtained by enzymatic degradation of primary cell-walls.*  
Biochemistry **8(3)**, 1155-1163 (1969)
- [8] LAMPORT D.T.A.  
*The protein component of primary cell walls.*  
Adv. Bot. Res. **2**, 151-218 (1965)
- [9] ESQUETERRE TUGAYÉ M.T.  
*Induction by elicitors and ethylene of proteins associated to the defence of plants.*  
Cellular Biology of Plant Stress, 459-473 (1985)

- [10] VARNER J.E.  
*Purification and characterization of a salt extractable Hydroxyprolin-rich Glycoprotein aerated Carrot Discs.*  
Biochem. Biophys. Res. Commun. **96**, 692-696
- [11] SHOWALTER A.M.  
*Structure and function of plant cell wall proteins.*  
Plant Cell **5**, 9-23 (1993)
- [12] STAFSTROM J.P., STAEHELIN L.A.  
*Cross-Linking Patterns in Salt-Extractable Extensins from Carrot Cell Walls.*  
Plant Physiol. **81**, 234-241
- [13] VARNER J.E., LIN S.L.  
*Plant cell wall architecture.*  
Cell **56**, 231-239 (1989)
- [14] BRADLEY D.J. et al.  
*Elicitor and wound induced oxidation cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel rapid defense response.*  
Cell **70**, 21-30 (1992)
- [15] FRY J.C. et al.  
*Extensin- a major cell wall glycoprotein.*  
Plant, Cell and Environment **9**, 239-260 (1986)
- [16] FRY J.C. et al.  
*Pulcherosin, an oxidatively coupled trimer of tyrosine in plant cell walls.*  
Phytochemistry **47**(3), 349-353 (1998)
- [17] FRY S.C.  
*Isodityrosine, a new cross-linking aminoacid from plat cell wall glycoprotein.*  
Biochem. J. **204**, 449-455 (1981)
- [18] LAMPORT D.T.A, et al.  
*Galactosylserine in Extensin.*  
Biochem. J. **133**, 125-131 (1973)

- [19] AKIYAMA Y., KATO K.  
*Structure of Hydroxyproline-arabinoside from Tobacco cells.*  
Agric. Biol. Chem. **40**, 2343 (1976)
- [20] KATO K., et al.  
*<sup>13</sup>C-NMR Analysis of Hydroxyproline Arabinosides from Nicotiana tabacum.*  
Agric. Biol. Chem. **44(10)**, 2487-2489 (1980)
- [21] NEUBERGER A., SELVENDRAN R., et al.  
*Structural studies of the carbohydrate moieties of lectins from potato tubers and thornapple.*  
Biochem. J. **201**, 199-208 (1982)
- [22] LAMPORT D.T.A.  
*Hydroxyproline-O-Glycosidic Linkage of the Plant Cell Wall Glycoprotein Extensin.*  
Nature **216**, 1322-1324 (1967)
- [23] SADDLER G., et al.  
*Extensin from suspension-cultured potato cells.*  
Planta **202**, 179-187 (1997)
- [24] Ettl H.  
*Die Gattung Chlamydomonas.*  
Beih. Nova Hedwigia **49**, 1122 (1976)
- [25] CASSAB G.I.  
*Plant Cell Wall Proteins.*  
Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **49**, 281-309 (1998)
- [26] WOESSNER J.P., GOODENOUGH U.W.  
*Molecular characterization of a zygote wall protein: an extensin-like molecule in Chlamydomonas reinhardtii.*  
Plant Cell **1**, 901-911 (1989)
- [27] WOESSNER J.P., GOODENOUGH U.W.  
*Volvocine cell walls and their constituent glycoproteins: an evolutionary perspective.*  
Protoplasma **181**, 245-258 (1994)

- [28] WOESSNER J.P. et al.  
*Domain conservation in several Volvocalean cell wall proteins.*  
Plant Mol. Biol. **26**, 947-960 (1994)
- [29] SUMPER M., HALLMANN A.  
*Biochemistry of the extracellular matrix of Volvox.*  
Int. Rev. Cytol. **180**, 51-85 (1998)
- [30] ADAIR W.S., SNELL W.J.  
*Organization and assembly of plant and animal extracellular matrix.*  
Acad. Press, New York 15-85 (1990)
- [31] WAFFENSCHMIDT S. , SPESSERT R., JAENICKE L.  
*Oligosaccharide side chains of wall molecules are essential for cell wall lysis in C.r.*  
Planta **175**, 513-519 (1988)
- [32] WAFFENSCHMIDT S., JAENICKE L.  
*Glykoproteine und Pflanzenzellkommunikation.*  
Chemie in unserer Zeit, 25. Jahrgang Nr.1, 29-43 (1991)
- [33] SPESSERT R., WAFFENSCHMIDT S.  
*Studies on the vegetative autolysin during the vegetative life cycle in Chlamydomonas.*  
European Journal of Cell Biology **51**, 17-22 (1990)
- [34] ADAIR W. S.  
*Characterization of Chlamydomonas sexual agglutinins.*  
J. Cell. Sci. Suppl. **2**, 233-260 (1985)
- [35] FERRIS P.J., et al.  
*Plus and minus sexual agglutinins from Chlamydomonas.*  
Plant Cell. **17(2)**, 597-615 (2005)
- [36] SCHLOESSER U.G.  
*Entwicklungsstadien- und sippenspezifische Zellwand-Autolysine bei der Freisetzung von Fortpflanzungszellen in der Gattung Chlamydomonas.*  
Ber. Deutsch. Bot. Ges. **89**, 1-56
- [37] JAENICKE L., et al.  
*Cell-wall lytic enzymes (autolysins) of Chlamydomonas reinhardtii are (hydroxyl) proline-specific proteases.*  
Eur. J. Biochem. **170**, 485-491

- [38] SAGER R., GRANICK S.  
*Nutritional control of Sexuality in Chlamydomonas reinhardtii.*  
J. Gen. Physiol. **37**, 729-742 (1954)
- [39] HARRIS E.H.  
*The Chlamydomonas Sourcebook.*  
Acad. Press Inc. (1989)
- [40] SNELL W.J.  
*Cell-cell interactions in Chlamydomonas.*  
Annu. Rev. Plant Physiol. **36**, 287-315 (1985)
- [41] van der ENDE H., et al.  
*Sexual agglutination in Chlamydomonas.*  
Adv. Microb. Physiol. **26**, 89-123
- [42] GOODENOUGH U.W., HEUSSER J.E.  
*The Chlamydomonas Cell Wall and its Constituent Glycoproteins Analyzed by the Quick-freeze, Deep-etch Technique.*  
J. Cell. Biol. **101**, 1550-1568 (1985)
- [43] ROBERTS K., et al.  
*Structure, Composition and Morphogenesis of the Cell Wall of Chlamydomonas reinhardtii.*  
J. Ultr. Res. **40**, 599-613 (1972)
- [44] WAFFENSCHMIDT S., et al.  
*Isodityrosine Cross-Linking Mediates Insolubilization of Cell Walls in Chlamydomonas.*  
The Plant Cell **5**, 809-820 (1993)
- [45] ADAIR W.S., et al.  
*Organization and assembly of plant and animal extracellular matrix.*  
Acad. Press, New York (1988), 25-41
- [46] KILZ S., et al.  
*In-Gel deglycosylation of SDS gelelektrophoresis separated glycoproteins for carbohydrate estimation by MALDI-TOF Mass spectrometry.*  
Journal of Mass spectrometry **37**, 331-335 (2002)



- [47] FERRIS P.J., et al.  
*Glycosylated Polyproline II Rods with Kinks as a Structural Motif in Plant Hydroxyproline-Rich Glykoproteins.*  
Biochemistry **40**, 2978-2987 (2001)
- [48] GOODENOUGH U.W., et al.  
*Crystals of the Chlamydomonas reinhardtii cell wall; Polymerization, Depolymerization and Purification of Glycoprotein Monomers.*  
The Journal of Cell Biology **103**, 405-417 (1986)
- [49] MILLER D.H., et al.  
*Hydroxyproline Heterooligosaccharides in Chlamydomonas.*  
Science **176**, 918-920 (1972)
- [50] KILZ S., WAFFENSCHMIDT S., BUDZIKIEWICZ H.  
*Mass spectrometric analysis of hydroxyproline glycans.*  
Journal of Mass Spectrometry **35**, 689-697 (2000)
- [51] COLEMAN A.W., et al.  
*Ribosomal DNA IST-1 and IST-2 Sequence Comparison as a Tool for Predicting Genetic Relatedness.*  
J. Mol. Evol. **45**, 168-177 (1997)
- [52] KIVIRIKKO K.I.,  
*Hydroxyprolin containing fractions in normal and cortisone-treated chick embryos.*  
Acta Physiol. Scand., **60** (210), 91-92 (1963)
- [53] KILZ S.  
*Biochemische Charakterisierung von Hydroxyprolin-reichen Glykoproteinen der Zellwand von Chlamydomonas reinhardtii.*  
Dissertationsschrift, Universität zu Köln (1999)
- [54] TAN L., QUI F., LAMPORT D.T., KIELISZEWSKI M.J.  
*Structure of a hydroxyproline (Hyp)-arabinogalactan polysaccharide from repetitive Ala-Hyp expressed in transgenic Nicotiana tabacum.*  
J. Biol. Chem. **279**(13), 13156-13165 (2004)

- [55] DOMON B., COSTELLO C.E.  
*A Systematic Nomenclature for Carbohydrate Fragmentations in FAB-MS/MS Spectra of Glycokonjugates.*  
Glycoconj. J. **5**, 397-409 (1988)
- [56] KOCHETKOV N.K., CHIZHOV O.S.  
*Mass spectrometry of methylated methyl glycosides.*  
Tetrahedon **21**, 2029-2047 (1965)
- [57] PETERSON G., SAMUELSON O.  
*Determination of the Number and Position of Methoxyl Groups in Methylated Aldohexoses by Mass Spectrometry of their Trimethylsilyl Derivatives.*  
Svensk Papperstidning arg. 20, 712-738 (Oktober 1968)
- [58] PETERSON G., SAMUELSON O.  
*Determination of the Number and Position of Methoxyl Groups in Methylated Aldopentoses by Mass Spectrometry of their Trimethylsilyl Derivatives.*  
Svensk Papperstidning arg. 3, 77-84 (Februar 1968)
- [59] AGRAWAL P.K.  
*NMR Spectroscopy in the Structural Elucidation of Oligosaccharides and Glycosides.*  
Phytochemistry **31(10)**, 3307-3330 (1992)
- [60] WAFFENSCHMIDT S.  
*Die stadienspezifische Regulation der Zellwandlyse bei der Grünalge Chlamydomonas reinhardtii.*  
Habilitationsschrift, Köln (1991)
- [61] WAFFENSCHMIDT S., JAENICKE L.  
*Autolysins in Chlamydomonas.*  
Teil der Habilitationsschrift, Köln (1991)
- [62] CAMPARGUE C., et al.  
*Analysis of Hydroxyproline and Hydroxyproline-Arabinosides of Plant Origin by High-Performance Anion-Exchange Chromatography-Pulsed Amperometric Detection.*  
Anal. Biochem., **257**, 20-25 (1998)

- [63] GUILLE G.R., et al.  
*A Rapid High-Resolution High-Performance Liquid Chromatographic Method for Separating Glycan Mixtures and Analyzing Oligosaccharide Profiles.*  
Anal. Biochem. **240**, 210-226 (1996)
- [64] O'NEILL M.A., ROBERTS K.  
*Methylation Analysis of Cell Wall Glycoproteins and Glycopeptides from Chlamydomonas reinhardtii.*  
Phytochemistry **20**, 25-28 (1981)
- [65] BARRETO-BERGTER E., GORIN P.A.J.  
*Structural chemistry of polysaccharides from fungi and lichens.*  
Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. **41**, 67-103 (1983)
- [66] LEVERY S.B., et al.  
*Structure elucidation of sphingolipids from the mycopathogen Paracoccidioides brasiliensis : An immunodominant  $\beta$ -galactofuranose residue is carried by a novel glycosylinositol phosphorylceramide antigen.*  
Biochemistry **37**, 8767-8775 (1998)
- [67] SASSAKI G.L., et al.  
*Postulan and branched  $\beta$ -galactofuranan from the phytopathogenic fungus Guignardia citricarpa, excreted from media containing glucose and sucrose.*  
Carbohydrate Polymers **48**, 385-389 (2002)
- [68] JONES C., et al.  
*Heterogeneity in the biosynthesis of mucin O-glykans from Trypanosoma cruzi Tulahen strain with the expression of novel galactofuranosyl-containing oligosaccharides.*  
Biochemistry **43**, 11889-11897 Jones (2004)
- [69] McNEIL M.R., et al.  
*Biosynthetic origin of mycobacterial cell wall galactofuranosyl residues.*  
Tuber Lung Dis. **78**, 123-131 (1997)
- [70] TONE-SHIMOKAWA Y., TOIDA T., KAWASHIMA T.  
*Isolation and structural analysis of polysaccharide containing galactofuranose from the cell walls of Bifidobacterium infantis.*  
J. Bacteriol. **178**(1), 317-320 (1996)

- [71] PAN F., JACKSON M., MA Y., McNEIL M.  
*Cell wall core galactofuran synthesis is essential for growth of mycobacteria.*  
J. Bacteriol. **183**(23), 3991-3998 (2001)
- [72] SUZUKI E., et al.  
*A monoclonal antibody directed to terminal residue of  $\beta$ -galactofuranose of a glycolipid from Paracoccidioides brasiliensis: cross-reactivity with Leishmania major and Trypanosoma cruzi.*  
Glycobiol. **7**, 463-468 (1997)
- [73] WHO (2002)  
Weekly Epidemiological Record (Geneva) **2**, 10-12
- [74] MIKUSOWA K., et al.  
*Biosynthesis of the galactan component of the myobacteriell cell-wall.*  
J. Biol. Chem. **275**, 33890-33897 (2000)
- [75] BEVERLY S.M., et al.  
*Eukaryotic UDP-Galactopyranose-Mutase (GLF-Gene) in Mikrobial and Metazoal Pathogens.*  
Eucaryotic Cell 1147-1154 (2005)
- [76] ROBINSON D.G., et al.  
*Biochemistry of Cell Walls.*  
Cambrigde University Press, 155-176
- [77] ZHONG R., YE Z.H.  
*Unraveling the function of glycosyltransferase family 47 in plants.*  
Trends in Plant Sciences **8**, 565-568 (2003)
- [78] SCHWEIBE W.R., PAULY M.  
*Glycosyltransferases and cell wall biosynthesis: novel players and insights.*  
Current Opinion Plant Biology **7**, 285-295 (2004)
- [79] OWENS R.W., NORTHCOTE D.H.  
*The location of arabinosyl:hydroxyproline transferase in the membrane system of potato tissue culture cells.*  
Biochem. J. **195**, 661-667 (1981)

- [80] DREES J.  
*Biochemische Untersuchungen zur Struktur und Biosynthese O-glykosylierter Proteine der Zellwand von Chlamydomonas reinhardtii.*  
Dissertationsschrift, Köln 1999
- [81] LAMPORT D.T.A., MILLER D.H.  
*Hydroxyproline Arabinosides in the Plant Kingdom.*  
Plant Physiol. **48**, 454-456 (1971)
- [82] GRAY G.R.  
*Reductive cleavage of permethylated polysaccharides.*  
Methods Enzymol. **138**, 26-38 (1987)
- [83] GRAY G.R.  
*Linkage analysis using reductive cleavage method.*  
Methods Enzymol. **193**, 573-578 (1990)
- [84] SAMSON M., et al.  
*Composition and properties of the sexual agglutinins of the flagellated green alga Chlamydomonas eugametos.*  
Planta **170**, 314-321
- [85] GROSSMANN A.R., et al.  
*Chlamydomonas reinhardtii genome project. A guide to the generation and use of the cDNA information.*  
Plant Physiol. **131**(2), 401-408 (2003)
- [86] KIELISZEWSKI M.J., LAMPORT D.T.A.,  
*Extensin: repetitive motifs, functional sites, posttranslational codes and phylogeny.*  
J. Plant 5 (2), 157-172 (1994)
- [87] KIELISZEWSKI M.J., SHPAK E.  
*Synthetic genes for the elucidation of glycosylation codes for arabinogalactan-proteins and other hydroxyproline-rich glycoproteins.*  
Cell. Mol. Life. Sci. **58**, 1386-1398 (2001)
- [88] SHPAK E., et al.  
*Synthetic genes for glycoprotein design and the elucidation of hydroxyprolin-O-glycosylation.*  
Proc. Natl. Acad. Sci. **96**, 14736-14741 (1999)

- [89] TAN L., et al.  
*Glycosylation motifs that direct arabinogalactan addition to arabinogalactan-proteins.*  
Plant Physiol. **132**(3), 1362-1369 (2003)
- [90] ZHAO Z.D., et al.  
*Tomato LeAGP-1 arabinogalactan-protein purified from transgenic tobacco corroborates the Hyp contiguity hypothesis.*  
The Plant Journal **31**(4), 431-444
- [91] HANKE G.  
*Untersuchungen an der Zellwand von Chlamydomonas reinhardtii.*  
Diplomarbeit, Universität zu Köln (1990)
- [92] HAKOMORI S.  
*A rapid permethylation of glycolipid and polysaccharide catalyzed by methylsulfinylcarbanion in dimethyl sulfoxide.*  
J. Biochem. **55**, 205-207
- [93] LAMPORT D.T.A., KIELISZEWSKI M.J., SHOWALTER A.M.  
*Salt stress upregulates periplasmic arabinogalactan proteins: using salt stress to analyse AGP function.*  
New Phytologist **169**, 479-492 (2006)

## 6.2 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb.</b>		<b>Seite</b>
(1)	Hydroxylierung von Prolin.	2
(2)	Elektronenmikroskopische Aufnahme von Extensinmolekülen aus Karotte [12].	4
(3)	Modell der Peroxidase katalysierten Bildung von Tyrosindimeren [17].	5
(4)	Struktur von HypAra <sub>3</sub> und HypAra <sub>4</sub> aus Extensinen höherer Pflanzen.	5
(5)	Vegetativer Reproduktionszyklus von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> [39].	7
(6)	Paarung der Gameten während der sexuellen Fortpflanzung von <i>C.r.</i>	8
(7)	Sexueller Reproduktionszyklus von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .	8
(8)	Die Zellwand von <i>Chlamydomonas</i> [42].	9
(9)	SDS-Gelelektrophorese der HRGPs aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .	11
(10)	Elektronenmikroskopische Aufnahmen und schematische Darstellungen der Glykoproteine GP1, GP2 und GP3 mit Längenangaben [48].	11
(11)	Repetitive Elemente der hochglykosylierten fibrillären Anteile von GP1 und GP2 der äußeren Zellwand von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .	12
(12)	Kationenaustauschchromatographie alkalisch hydrolysierter <i>Arabidopsis thaliana</i> -Zellen.	16
(13)	HPLC-Trennung der Aminex-Fraktionen A und B.	17
(14)	Nomenklatur von ESI-MS <sup>n</sup> –Fragmentationen von linearen Glykanen nach Domon und Costello [57].	18
(15)	ESI-MS-Gesamtspektren der HPLC-Fraktionen A1 und B1.	19
(16)	ESI-MS <sup>2</sup> -Spektren der HPLC-Fraktionen A1 und B1.	20
(17)	Gaschromatogramm von HPLC-Fraktion A1 (HypAra <sub>4</sub> ).	21

## Abbildungsverzeichnis

---

(18)	Gaschromatogramm der Analyse von HypAra <sub>3</sub> (HPLC-Fraktion B1) aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .	23
(19)	EI-Fragmentierung des Derivates der 1,2 verbundenen Arabinose aus HypAra <sub>3</sub> (HPLC-Fraktion B1).	24
(20)	EI-Fragmentierung des Derivates von terminaler Arabinose aus HypAra <sub>3</sub> (HPLC-Fraktion B1).	25
(21)	Verknüfungspositionen der Arabinoseeinheiten von HypAra <sub>3</sub> aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .	26
(22)	Gaschromatogramm der GC-MS-Analyse von HypAra <sub>4</sub> (HPLC-Fraktion A1) aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .	26
(23)	EI-Fragmentierung des Derivates von 1,3 verknüpfter Arabinose aus HypAra <sub>4</sub> (HPLC-Fraktion A1).	27
(24)	Verknüfungspositionen der Arabinoseeinheiten von HypAra <sub>4</sub> aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .	28
(25)	H-C-Korrelationen im Bereich der glykosidischen Bindungen der vier aus <i>Arabidopsis thaliana</i> gereinigten HypGlykane.	30
(26)	Mögliche Stellungsunterschiede der Hydroxyprolinreste der beiden Verbindungen Hyp-Ara <sub>3</sub> der HPLC-Fraktionen B1 und B2.	32
(27)	NOESY-Experimente von HypAra <sub>3</sub> aus den HPLC-Fraktionen B1 und B2.	33
(28)	Hydroxyprolin gebundene Glykane HypAra <sub>3</sub> und HypAra <sub>4</sub> aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .	35
(29)	Kationenaustauschchromatographie eines alkalischen Hydrolysates von 3 g Rohextrakt aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .	37
(30)	ESI-Gesamtspektrum von Aminexfraktion D eines Rohextrakthydrolysates aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .	38
(31)	ESI-MS <sup>2</sup> -Fragmentierung eines linearen HypGlykans der Masse 557 u.	39
(32)	Sequenzfolge eines Hydroxyprolin gebundenen Glykans mit einer Masse von 557 u.	39



## Abbildungsverzeichnis

---

(33)	ESI-MS <sup>n</sup> -Stoßexperimente einer Glykanstruktur bei m/z 602 u.	41
(34)	HPLC-Trennung von HypGlykanen des Größenbereiches von 550-900 u aus Aminex-Fraktion C der <i>Chlamydomonas</i> Aufarbeitung.	43
(35)	MS-Gesamtspektrum und MS <sup>2</sup> -Analyse von HPLC-Fraktion 51 aus Aminex-Fraktion C.	43
(36)	Sequenzfolge eines linearen HypGlykans einer Masse von 703 u aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .	44
(37)	Sequenzfolgen der HypGlykane der Massen von 557 u (links) und 571 u (rechts) aus Aminex-Fraktion D einer <i>Chlamydomonas</i> Zellwandpräparation.	44
(38)	GC-Analyse eines Hydroxyprolin gebundenen Glykans einer Masse von 557 u aus Aminex-Fraktion D.	45
(39)	Gaschromatogramm zur Methylierungsanalyse von HypAra <sub>2</sub> Gal aus Aminex-Fraktion D.	46
(40)	EI-Fragmentierung bei 23,25 Minuten der Methylierungsanalyse eines Hydroxyprolin gebundenen Glykans der Sequenz HypAra <sub>2</sub> Gal aus Aminex-Fraktion D.	47
(41)	EI-Fragmentierung zum Zeitpunkt von 24,77 Minuten der Analyse von HypAra <sub>2</sub> Gal aus Aminex-Fraktion D.	48
(42)	Struktur des Hydroxyprolin gebundenen Glykans HypAra <sub>2</sub> Gal aus Aminex-Fraktion D.	49
(43)	EI-Spektrum zum Zeitpunkt von 24,8 Minuten der Analyse des Glykans einer Masse von 571 u aus Aminex-Fraktion D.	49
(44)	Struktur des Hydroxyprolin gebundenen Glykans einer Masse von 571 u aus Aminex-Fraktion D.	50
(45)	EI-Fragmentierung bei 27,24 Minuten der Methylierungsanalyse eines Hydroxyprolin gebundenen Glykans der Masse 703 u aus Aminex-Fraktion C.	51
(46)	EI-Fragmentierung bei 22,15 Minuten des Hydroxyprolin gebundenen Glykans einer Masse von 703 u aus Aminex-Fraktion C.	52

(47)	Struktur eines HypGlykans einer Masse von 703 u aus Aminex-Fraktion C.	52
(48)	H-C-Cosy-Spektren im Bereich der glykosidischen Bindungen der jeweils Trans- und Cis-Hydroxyprolin gebundenen Glykane der Massen 557 u und 703 u.	53
(49)	HypGlykane aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> . Gezeigt sind die dominanten kürzerkettigen Glykane der Aminex-Fraktionen C und D.	57
(50)	Aminex-Kationenaustauschchromatographie einer <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Zellwandpräparation.	58
(51)	ESI-MS Spektrum von HypGlykanen aus Aminexfraktion 8.	59
(52)	Gaschromatogramm zur Methylierungsanalyse von Aminex-Fraktion 8.	60
(53)	EI-Fragmentierung bei 24,85 Minuten der Methylierungsanalyse von Aminex-Fraktion 8.	61
(54)	EI-Fragmentierung bei 24,63 Minuten der Methylierungsanalyse von Aminex-Fraktion 8.	62
(55)	Hydroxyprolin gebundene Glykane aus Aminex-Fraktion 8.	63
(56)	ESI-MS-Gesamtspektrum Hydroxyprolin gebundener Glykane aus Aminex-Fraktion 7.	64
(57)	Gaschromatogramm zur Methylierungsanalyse von Aminex-Fraktion 7.	64
(58)	ESI-MS-Gesamtspektrum Hydroxyprolin gebundener Glykane aus Aminex-Fraktion 5.	65
(59)	Gaschromatogramm zur Methylierungsanalyse von Aminex-Fraktion 5.	66
(60)	EI-Fragmentierung bei 26,20 Minuten der Methylierungsanalyse von Aminex-Fraktion 5.	67
(61)	Hydroxyprolin gebundene Glykane der Aminex-Fraktionen 5 und 6.	69
(62)	ESI-MS-Gesamtspektrum von Aminex-Fraktion 4.	70
(63)	Gaschromatogramm zur Methylierungsanalyse von Aminex-Fraktion 4.	71

(64)	EI-Fragmentierung bei 24,05 Minuten der Methylierungsanalyse von Aminex-Fraktion 4.	71
(65)	GC-Analyse der Monomereinheiten aus Aminex-Fraktion 4.	72
(66)	GC-Analyse der Monomereinheiten von Aminex-Fraktion 3.	72
(67)	ESI-MS-Gesamtanalyse Hydroxyprolin gebundener Glykane aus Aminex-Fraktion 3.	73
(68)	ESI-MS <sup>2</sup> -Experiment des linearen Hydroxyprolin gebundenen Glykans einer Masse von 865 u (888 M+Na <sup>+</sup> ) aus Aminex-Fraktion 3.	73
(69)	Gaschromatogramm zur Methylierungsanalyse von Aminex-Fraktion 3.	74
(70)	Hydroxyprolin gebundenes Glykan einer Masse von 719 u.	75
(71)	EI-Fragmentierung bei 25,65 Minuten der Methylierungsanalyse von Aminex-Fraktion 3.	76
(72)	EI-Fragmentierung bei 28,43 Minuten der Methylierungsanalyse von Aminex-Fraktion 3.	76
(73)	Gaschromatogramm zur Methylierungsanalyse von Aminex-Fraktion 1.	77
(74)	ESI-MS-Gesamtspektrum von Aminex-Fraktion 4 der <i>Chlamydomonas incerta</i> Aufarbeitung.	81
(75)	ESI-MS <sup>2</sup> -Stoßfragmentierung eines HypGlykans einer Masse von 703 u aus Aminex-Fraktion 4 der <i>Chlamydomonas incerta</i> Zellwandpräparation.	81
(76)	Gaschromatogramme zur Methylierungsanalyse der beiden Aminex-Fraktionen 4 aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> und <i>Chlamydomonas incerta</i> im Vergleich.	82
(77)	Gaschromatogramm zur Bestimmung der Monomerbestandteile von Aminex-Fraktion 4 aus <i>Chlamydomonas incerta</i> .	83
(78)	Kationenaustauschchromatographie der Zellwandhydrolysate asynchroner <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Zellen aus Kapitel 2.2.	86
(79)	Verteilung von Hydroxyprolin in %, in die Signalbereiche 1-9 von Sporangien und Zoosporen bei gleicher Aminex-Fraktionierung.	87

(80)	ESI-MS-Gesamtspektrum von Aminex-Fraktion 4 der Sporangienzellwandpräparation.	88
(81)	ESI-MS-Gesamtspektrum von Aminex-Fraktion 7 einer Sporangienzellwandpräparation.	89
(82)	Gaschromatogramme von Methylierungsanalysen der Aminex-Fractionen 4 von Sporangien und Zoosporen sowie Fraktion D der asynchronen Zellen.	90
(83)	Gaschromatogramme von Methylierungsanalysen der Aminex-Fractionen 3 von Sporangien und Zoosporen sowie Fraktion C der asynchronen Zellen.	92
(84)	Gaschromatogramm zur Methylierungsanalyse von Aminex-Fraktion 7 der Sporangienaufarbeitung.	93
(85)	<i>Arabidopsis thaliana</i> , die Ackerschmalwand.	97
(86)	Gemeinsame Reaktionsschritte bei der O-Glykosylierung von Hydroxyprolin von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> und <i>Arabidopsis thaliana</i> .	98
(87)	Phylogenetischer Baum der eukaryotischen Galaktopyranosemutase-Familie nach Beverly [74].	100
(88)	Biosynthese Hydroxyprolin gebundener Glykane aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> bis zu einer Kettenlänge von vier Zuckermomeren.	102
(89)	Methylierungsanalyse und reduktiver Abbau nach Gray (1987)	104
(90)	Lyse der Sporangienzellwand bei der vegetativen Fortpflanzung von <i>Chlamydomonas</i> [33].	106
(91)	Raum-Modell einer pp-II-Helix mit verschiedenen glykosylierten Bereichen.	107
(92)	Mechanismus der $\beta$ -Eliminierung.	116
(93)	Nomenklatur von ESI-MS <sup>n</sup> -Fragmentationen von linearen Glykanen nach Domon und Costello.	123
(94)	Nomenklatur von ESI-MS <sup>n</sup> -Fragmentationen von verzweigten Glykanen nach Domon und Costello.	123
(95)	Gaschromatogramm der Zuckerstandards.	125

(96)	Derivatisierungsschema am Beispiel eines HypGlykans der Sequenzfolge HypPentose <sub>3</sub> .	127
(97)	Theoretische Fragmentationen bei der EI-Fragmentierung einer 1,2-verknüpften Pentofuranose nach entsprechender Aufarbeitung zum 1,2,4 Tri-O-Acetyl-1-Deuterio-3,5-Di-O-Deuteromethylpentosid.	128
(98)	(A): H-C-Korrelation eines Hydroxyproline gebundenen Glykans mit drei glykosidischen Bindungen. (B): Ausschnitt im Bereich der anomeren C-Atome und Kopplung benachbarter H-Atome in diesem Bereich.	133
(99)	Schema eines NOESY-Experimentes.	134
(100)	ESI-MS-Gesamtspektrum von HypAra <sub>3</sub> aus HPLC-Fraktion B1.	142
(101)	ESI-MS <sup>2</sup> -Spektrum von HypAra <sub>3</sub> aus HPLC-Fraktion B1.	142
(102)	ESI-MS-Gesamtspektrum von HypAra <sub>3</sub> aus HPLC-Fraktion B2.	143
(103)	ESI-MS <sup>2</sup> -Spektrum von HypAra <sub>3</sub> aus HPLC-Fraktion B2.	143
(104)	ESI-MS-Gesamtspektrum von HypAra <sub>4</sub> aus HPLC-Fraktion A1.	144
(105)	ESI-MS <sup>2</sup> -Spektrum von HypAra <sub>4</sub> aus HPLC-Fraktion A1.	144
(106)	ESI-MS-Gesamtspektrum von HypAra <sub>4</sub> aus HPLC-Fraktion A2.	145
(107)	ESI-MS <sup>2</sup> -Spektrum von HypAra <sub>4</sub> aus HPLC-Fraktion A2.	145
(108)	ESI-MS-Gesamtspektrum von Aminex-Fraktion 8.	146
(109)	ESI-MS-Gesamtspektrum von Aminex-Fraktion 7.	146
(110)	ESI-MS-Gesamtspektrum von Aminex-Fraktion 6.	147
(111)	ESI-MS-Gesamtspektrum von Aminex-Fraktion 5.	147
(112)	ESI-MS-Gesamtspektrum von Aminex-Fraktion 4.	148
(113)	ESI-MS <sup>2</sup> -Spektrum von HypAra aus Aminex-Fraktion 8.	148
(114)	ESI-MS <sup>2</sup> -Spektrum von HypAra <sub>2</sub> aus Aminex-Fraktion 8.	149

(115)	ESI-MS <sup>2</sup> -Spektrum von HypAra <sub>2</sub> Gal aus Aminex-Fraktion 8.	149
(116)	ESI-MS <sup>2</sup> -Spektrum von HypAra <sub>2</sub> GalMe aus Aminex-Fraktion 8.	150
(117)	ESI-MS <sup>2</sup> -Spektrum von HypAra <sub>2</sub> GalAra aus Aminex-Fraktion 6.	150
(118)	ESI-MS <sup>2</sup> -Spektrum von HypAra <sub>2</sub> GalAraMe aus Aminex-Fraktion 6.	151
(119)	ESI-MS <sup>2</sup> -Spektrum von HypAra <sub>2</sub> GalGalMe und HypAra <sub>2</sub> GalMeGal aus Aminex-Fraktion 6.	151
(120)	ESI-MS <sup>2</sup> -Spektrum von HypAra <sub>2</sub> GalGlu Aminex-Fraktion 4.	152
(121)	EI-Fragmentierung des Derivates der terminalen Arabinose von HypAra <sub>4</sub> aus HPLC-Fraktion A2.	152
(122)	EI-Fragmentierung des Derivates der 1,2 verbundenen Arabinose von HypAra <sub>4</sub> aus HPLC-Fraktion A2.	153
(123)	EI-Fragmentierung des Derivates der 1,3 verbundenen Arabinose von HypAra <sub>4</sub> aus HPLC-Fraktion A2.	153
(124)	EI-Fragmentierung des Derivates der terminalen Arabinose von HypAra <sub>3</sub> aus HPLC-Fraktion B2.	154
(125)	EI-Fragmentierung des Derivates der 1,2 verbundenen Arabinose von HypAra <sub>4</sub> aus HPLC-Fraktion B2.	154
(126)	Gaschromatogramm zur Methylierungsanalyse von Aminex Fraktion 8.	155
(127)	Gaschromatogramm zur Methylierungsanalyse von Aminex Fraktion 7.	155
(128)	Gaschromatogramm zur Methylierungsanalyse von Aminex Fraktion 6.	156
(129)	Gaschromatogramm zur Methylierungsanalyse von Aminex Fraktion 5.	156
(130)	Gaschromatogramm zur Methylierungsanalyse von Aminex Fraktion 4.	157
(131)	Gaschromatogramm zur Methylierungsanalyse von Aminex Fraktion 3.	157
(132)	Gaschromatogramm zur Methylierungsanalyse von Aminex Fraktion 2.	158
(133)	Gaschromatogramm zur Methylierungsanalyse von Aminex Fraktion 1.	158

(134)	EI-Spektrum perdeuteromethylierter, acetylierter, terminaler Arabinose.	159
(135)	EI-Spektrum perdeuteromethylierter, acetylierter, terminaler C <sub>3</sub> -methylierter Arabinose.	160
(136)	EI-Spektrum perdeuteromethylierter, acetylierter, 1,2 verbundener Arabinose.	161
(137)	EI-Spektrum perdeuteromethylierter, acetylierter, 1,3 verbundener Hexopyranose.	162
(138)	EI-Spektrum perdeuteromethylierter, acetylierter, terminaler Hexopyranose.	163
(139)	EI-Spektrum perdeuteromethylierter, acetylierter, terminaler Hexofuranose und terminaler C <sub>6</sub> -methylierter Hexofuranose.	164
(140)	EI-Spektrum perdeuteromethylierter, acetylierter, 1,2,5 verbundener Arabinose.	165
(141)	EI-Spektrum perdeuteromethylierter, acetylierter, 1,2 verbundener Hexopyranose.	166
(142)	EI-Spektrum perdeuteromethylierter, acetylierter, 1,3 verbundener Hexofuanose und C <sub>6</sub> -methylierter 1,3 verbundener Hexofuranose.	167
(143)	EI-Spektrum perdeuteromethylierter, acetylierter, 1,2,3,5 verbundener Arabinose.	168
(144)	EI-Spektrum perdeuteromethylierter, acetylierter, terminaler 1,4 verbundener Hexopyranose oder 1,5 verbundener Hexofuranose.	169
(145)	EI-Spektrum perdeuteromethylierter, acetylierter, terminaler 1,3,4 verbundener Hexopyranose oder 1,3,5 verbundener Hexofuranose.	170
(146)	GC-Analyse nach saurer Hydrolyse des HypGlykans einer Masse von 571 u.	171
(147)	GC-Analyse nach saurer Hydrolyse des HypGlykans einer Masse von 703 u.	171
(148)	<sup>1</sup> H-Resonanzen des HypGlykans einer Masse von 703 u aus HPLC-Fraktion 51 aus Kapitel 2.2.	172
(149)	<sup>1</sup> H-Resonanzen des HypGlykans einer Masse von 703 u aus HPLC-Fraktion 38 aus Kapitel 2.2.	173

### 6.3 Tabellenverzeichnis

<b>Tab.</b>		<b>Seite</b>
(1)	Chemische Verschiebung von $^{13}\text{C}$ - und $^1\text{H}$ -Atomen im Bereich der glykosidischen Bindung der vier aus <i>Arabidopsis</i> isolierten HypGlykane.	31
(2)	$^{13}\text{C}$ - und $^1\text{H}$ -Verschiebungen der Hydroxyprolinreste der HypGlykane einer Sequenz HypAra <sub>3</sub> aus den HPLC-Fractionen B1 und B2.	32
(3)	Glykane der Zellwand von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> und ihre Monomierzusammensetzung.	40
(4)	Glykane der äußeren Zellwand von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .	42
(5)	$^{13}\text{C}$ - und $^1\text{H}$ -Verschiebungen der Hydroxyprolinreste von HypAra <sub>2</sub> Gal und Hyp-Ara <sub>2</sub> -Gal-Ara(Me) aus den Aminex-Fractionen C und D.	54
(6)	$^{13}\text{C}$ - und $^1\text{H}$ -Verschiebungen der Hydroxyprolinreste von HypAra <sub>2</sub> Gal und HypAra <sub>2</sub> GalAra(Me) aus den Aminex-Fractionen C und D.	55
(7)	ESI-MS-Analyse von Aminex-Fraktion 8.	59
(8)	ESI-MS-Analyse von Aminex-Fraktion 5.	66
(9)	ESI-MS-Analyse des HypGlykans einer Masse von 719 u (742 M+Na <sup>+</sup> ) aus Aminex-Fraktion 4.	70
(10)	Monomerbestandteile der Hydroxyprolin gebundenen Glykane aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .	78
(11)	Schema der Präparation Hydroxyprolin gebundener Glykane.	111
(12)	TAP-Medium (nach GORMAN und LEVINE, 1965).	112
(13)	HUTNER's Spurenelementlösung, in Abänderung nach HARRIS, 1989).	113
(14)	HPLC-Gradient zur Trennung Cis- und Trans-Hydroxyprolin gebundener, kürzerer Hydroxyprolin gebundener Glykane (Kapitel 2.1 und 2.2).	120
(15)	Testlösungen für den Kivirikko-Test.	121



## Tabellenverzeichnis

---

(16)	Versuchsparameter der gaschromatographischen Analyse der HypGlykan-Monomere.	125
(17)	Derivatisierungsprotokoll der Methylierungsanalyse.	130
(18)	Parameter der gaschromatographischen Trennung.	132
(19)	Dissoziations-Probenpuffer.	135
(20)	Dichtegel.	136
(21)	Trenngel (7,5%).	136
(22)	Sammelgel (4%).	136
(23)	Elektrophoresepuffer, pH 8,3.	137
(24)	Proteinmarker bei der Gelelektrophorese.	137
(25)	Coomassie-Blaufärbung.	138
(26)	Silberfärbung nach Dernick und Heukeshoven.	138
(27)	Lowry-Lösungen.	139
(28)	Biuret-Lösungen.	140
(29)	Theoretische und beobachtete Fragmentionen bei der EI-Fragmentierung derivatisierter terminaler Arabinose.	159
(30)	Theoretische und beobachtete Fragmentionen bei der EI-Fragmentierung derivatisierter terminaler C <sub>3</sub> -methylierter Arabinose.	160
(31)	Theoretische und beobachtete Fragmentionen bei der EI-Fragmentierung derivatisierter 1,2 verbundener Arabinose.	161
(32)	Theoretische und beobachtete Fragmentionen bei der EI-Fragmentierung derivatisierter 1,3 verbundener Hexopyranose.	162
(33)	Theoretische und beobachtete Fragmentionen bei der EI-Fragmentierung derivatisierter terminaler Hexopyranose.	163
(34)	Theoretische und beobachtete Fragmentionen bei der EI-Fragmentierung derivatisierter terminaler Hexofuranose.	164

## Tabellenverzeichnis

---

(35)	Theoretische und beobachtete Fragmentationen bei der EI-Fragmentierung derivatisierter 1,2,5 verbundener Arabinose.	165
(36)	Theoretische und beobachtete Fragmentationen bei der EI-Fragmentierung derivatisierter 1,2,5 verbundener Arabinose.	166
(37)	Theoretische und beobachtete Fragmentationen bei der EI-Fragmentierung derivatisierter 1,3 verbundener Hexofuranose.	167
(38)	Theoretische und beobachtete Fragmentationen bei der EI-Fragmentierung derivatisierter 1,2,3,5 verbundener Arabinose.	168
(39)	Theoretische und beobachtete Fragmentationen bei der EI-Fragmentierung derivatisierter 1,4 verbundener Hexopyranose oder 1,5 verbundener Hexofuranose.	169
(40)	Theoretische und beobachtete Fragmentationen bei der EI-Fragmentierung derivatisierter 1,3,4 verbundener Hexopyranose oder 1,3,5 verbundener Hexofuranose.	170

## 6.4 Abkürzungsverzeichnis

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>AGPs</b>	Arabinogalaktanproteine
<b>APS</b>	Ammoniumperoxodisulfat
<b>Ara</b>	Arabinose
<b>AS</b>	Aminosäure
<b>A.t.</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<b>BSA</b>	Rinderserumalbumin
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>CID</b>	Collision Induced Dissoziation
<b>C.r.</b>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
<b>dest.</b>	Destilliert
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>E</b>	Extinktion
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>EI</b>	Elektronen Stoßionisation
<b>ELISA</b>	Enzym-gekoppelter-Immunnachweis
<b>ER</b>	Endoplasmatisches Retikulum
<b>ESI</b>	Elektrosprayionisation
<b>et al.</b>	et aliter
<b>FID</b>	Flammenionisationsdetektor
<b>g</b>	Erdbeschleunigung
<b>g</b>	Gramm
<b>Gal</b>	Galaktose
<b>GC</b>	Gaschromatographie
<b>Glu</b>	Glukose
<b>GP</b>	Glykoprotein
<b>GRP</b>	Glycinreiches Protein
<b>h</b>	Stunde
<b>HM</b>	High-Molecular-Weight-Marker
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatographie
<b>HRGP</b>	Hydroxyprolinreiches Glykoprotein

<b>Hyp</b>	Hydroxyprolin
<b>Kap.</b>	Kapitel
<b>l</b>	Liter
<b>MALDI</b>	Matrix associated laser desorption ionization
<b>M</b>	Molarität [mol / l]
<b>mA</b>	Milliampere
<b>Man</b>	Mannose
<b>Me</b>	Methylgruppe
<b>µg</b>	Mikrogramm
<b>MG</b>	Molekulargewicht
<b>min</b>	Minute
<b>µl</b>	Mikroliter
<b>mm</b>	Millimeter
<b>MS</b>	Massenspektrometrie
<b>m/V</b>	Masse pro Gesamtvolumen
<b>Myo-Ino</b>	Myo-Inositol
<b>N</b>	Normalität
<b>ng</b>	Nanogramm
<b>NMR</b>	Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
<b>NOE</b>	Nuclear Overhauser Effekt
<b>NOESY</b>	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
<b>PAGE</b>	Polyacrylamid Gelelektrophorese
<b>p-DMAB</b>	Para-Dimethylaminobenzaldehyd
<b>pH</b>	potentium hydrogenii
<b>Pro</b>	Prolin (P)
<b>PRP</b>	Prolinreiches Protein
<b>PSW</b>	Perchloratlöslicher Zellwandbereich
<b>PTFE</b>	Polytetrafluorethylen
<b>RE</b>	Rohextrakt
<b>rpm</b>	rotations per minute
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>sec</b>	Sekunde
<b>s.</b>	Siehe

<b>s.a.</b>	siehe auch
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>Ser</b>	Serin (S)
<b>s.o.</b>	siehe oben
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>TAP</b>	Tris-Acetat-Phosphat-Medium
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
<b>TFA</b>	Trifluoressigsäure
<b>TOF</b>	Flugzeit (time of flight)
<b>Tris</b>	Tris-(Hydroxymethyl)-aminoethan
<b>u.a.</b>	unter anderem
<b>UDP</b>	Uridindiphosphat
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>V</b>	Volt
<b>vgl.</b>	vergleiche
<b>V/V</b>	Volumen pro Gesamtvolumen
<b>W</b>	Watt
<b>W1, W2, W4, W6, W7</b>	Zellwandbereiche von <i>C. reinhardtii</i>
<b>Xyl</b>	Xylose
<b>z.B.</b>	zum Beispiel

## 7 Kurzzusammenfassung

Die Superfamilie der extrazellulären Hydroxyprolinreichen Glykoproteine (HRGPs) ist ein im Pflanzenreich nahezu ubiquitärer Bestandteil der extrazellulären Matrix von Pflanzen. HRGPs besitzen in ihrer Primärsequenz Hydroxyprolin-reiche Motive, die posttranslational modifiziert werden und O-glykosidisch an Hydroxyprolin gebundene Zuckerseitenketten tragen. Die Funktionen der HRGPs sind vielfältig. Die Proteine verstärken die Zellwand geben ihr aber gleichzeitig auch die nötige Flexibilität. Daneben besitzen Hydroxyprolinreiche Glykoproteine wichtige Funktionen bei der Pathogenabwehr, bei Wundheilungsprozessen und bei Zell-Zell-Interaktionen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Hydroxyprolin gebundenen Glykane aus *Arabidopsis thaliana* und *Chlamydomonas reinhardtii* gereinigt und strukturell untersucht. Zur vollständigen Bestimmung der Struktur von kurzen linearen Hydroxyprolin gebundenen Glykane wurden Reinfractionen durch Ionenaustauschchromatographie und HPLC gewonnen. Diese wurden massenspektrometrisch, gaschromatographisch, durch Methylierungsanalyse und magnetische Kernresonanzspektroskopie bestimmt.

Die Analysen der Hydroxyprolin gebundenen Glykane von *Arabidopsis thaliana* bestätigen zunächst den aus Karotte oder Tabak bekannten Aufbau der Verbindungen HypAra<sub>3</sub> und HypAra<sub>4</sub> und unterstützen damit die Theorie, dass die Extensine aller höheren Landpflanzen die gleichen Glykosylierungsmuster aufweisen.

Die über HPLC gereinigten Glykane der Grünalge *C. reinhardtii* tragen die für höhere Pflanzen beschriebenen zwei  $\beta$ -L-1,2 verbundenen Arabinofuranosen als erste Baueinheiten. Die Kettenverlängerung zum Hyp-triglykan erfolgt durch Anhängen einer  $\beta$ -D-Galaktose, die zudem auch an C<sub>6</sub> methyliert sein kann. In den gereinigten Hyp-tetrasacchariden wurde eine weitere  $\alpha$ -L-Arabinofuranose terminal bestimmt, die ebenfalls an C<sub>3</sub> methyliert vorliegen kann. Das gemeinsame innere Grundelement der zwei  $\beta$ -L-1,2 verbundenen Arabinofuranosen in Hyp-Glykanen der Alge und höherer Pflanzen lässt auf einen gemeinsamen evolutiven Ursprung rückschließen.

Das weitere Augenmerk der Arbeit galt der wesentlich höheren Komplexität der *C. reinhardtii* Glykane und wurde vorwiegend an durch Kationenaustauschchromatographie angereicherten Präparationen durchgeführt, die massenspektrometrisch, gaschromatographisch und durch Methylierungsanalysen charakterisiert wurden. Dabei wurden für die Hyp-Glykane bis zu einer Größe von vier gebundenen Zuckern aus *C. reinhardtii* folgende Gesetzmäßigkeiten gefunden:

1. Die HypGlykane aus *Chlamydomonas* tragen ebenso wie die Extensine höherer Pflanzen zwei an Hydroxyprolin gebundene  $\beta$ -L-1,2 verbundene Arabinofuranosen.
2. Diese Grundeinheit wird bei allen *Chlamydomonas* Glykanen immer durch ein Galaktosemonomer verlängert, das vorwiegend in Furanoseform vorliegt.
3. Die Verlängerung zu den Hyp-tetrasachchariden kann über Arabinose, Galaktose oder Glukose erfolgen.
4. Methylierungen erfolgen spezifisch und ausschließlich an einem Zucker, der entweder in Position C oder D des Hyp-Glykans zu finden ist.

Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um ein Charakteristikum der ganzen Gattung, denn auch die Untersuchung einer weiteren *Chlamydomonas* Art, von *Chlamydomonas incerta*, bestätigen diese Befunde. Weiterhin erlauben die gewonnenen Ergebnisse den Rückschluss auf die wesentlichen Schritte der Biosynthese der Verbindungen und auf die an der Synthese beteiligten, noch unbekannten Glykosyltransferasen.

Untersuchungen zur Abhängigkeit der Glykosylierung vom Zellzyklus zeigen schließlich einen Umbau der Hydroxyprolin gebundenen Glykane während der vegetativen Fortpflanzung der Grünalge. Die Methylierungsanalysen lassen hierbei vermuten, dass an dieser Umstrukturierung die 1,2 verbundenen Arabinosemonomere der HypGlykane beteiligt sind.

## 8 Summary

Members of the superfamily of hydroxyproline-rich glycoproteins (HRGPs) can be found in the extracellular matrix throughout the plant kingdom. HRGPs show characteristic hydroxyproline-rich, repetitive motifs, which are posttranslationally modified by o-linked glycans bound to hyp. Functions of HRGPs are multifarious. They strengthen the wall, but provide additional flexibility at the same time. Furthermore, HRGP have important functions during pathogen defence, wound healing and cell-cell-interaction.

During this study, hydroxyproline bound glycans from *Arabidopsis thaliana* and *Chlamydomonas reinhardtii* were purified and structurally characterized. For a detailed structural analysis, short linear hyp glycans were purified to homogeneity by cation exchange chromatography and HPLC. The respective isolated compounds were analysed by mass spectrometry (ESI-MS), gaschromatography, methylation analysis (GC-MS) and nuclear magnetic resonance.

The data obtained for hyp glycans isolated from *Arabidopsis thaliana* corroborate the structures for HypAra<sub>3</sub> and HypAra<sub>4</sub> determined for carrot and tobacco and support the general idea, that hyp-glycans from higher plants have a conserved glycosylation pattern.

The HPLC-purified hyp-glycans isolated from *C. reinhardtii* were shown to contain the same two  $\beta$ -L-1,2 linked arabinoses as inner core like those observed in the higher plant hyp glycans. The hyp-bound trisaccharide is formed by addition of a  $\beta$ -D-galactose, which can be methylated on C<sub>6</sub>-position. The purified hyp-tetrasaccharides contained another terminal  $\alpha$ -L-arabino-furanose, which can be methylated at C<sub>3</sub>-position. The existence of the common inner core element of two  $\beta$ -L-1,2-linked arabinofuranoses suggests one evolutionary offspring.

The second interest of this study was directed towards understanding the complexity of hyp-glycosylation in *C. reinhardtii*. The analysis was performed using enriched hyp-glycan fractions obtained by cation-exchange-chromatography which were analysed by mass spectrometry, gaschromatography and methylation analysis. According to the data obtained following rules for hyp-glycans (with up to four bound sugars) in *C. reinhardtii* seem to emerge:



1. There are always two  $\beta$ -L-1,2 arabinosefuranoses linked to hydroxyproline.
2. Galactose, predominantly in its unusual furanose-form, is always linked to the inner core described in 1.
3. The hyp-ara<sub>2</sub>-gal trisaccharide is substrate for another arabinosyltransferase, a glucosyl- or galactosyltransferase.
4. methylation of sugars is specific; there is never more than one sugar species with a position in C or D methylated.

This rules seem to be characteristic for the genus *Chlamydomonas* in general, as the analysis of *C. incerta* hyp-glycans supported the findings obtained for *C. reinhardtii* hyp-glycans. Furthermore, the data obtained allow important conclusion towards the biosynthetic pathway of hyp-glycans in *Chlamydomonas* as well as enzymes involved, none of which are known so far.

Preliminary analysis of glycosylation patterns suggest a rearrangement of hyp-glycans during the cell cycle. The data of the methylation analysis suggest that the  $\beta$ -1-2-linked arabinoses might be crucially involved in that process.

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Sabine Waffenschmidt für das interessante Thema dieser Arbeit, die fachliche Betreuung, ihre stetige Diskussionsbereitschaft, ihr persönliches Interesse und auch dafür, dass ich viel über mich und für mein weiteres Leben gelernt habe.

Bei Herrn Prof. Dr. Dietmar Schomburg bedanke ich mich herzlich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Franz Josef Marner und seiner Arbeitsgruppe für die freundschaftliche Zusammenarbeit, die fortwährende Unterstützung und die vielen fachlichen Hilfen unter anderem bei der Auswertung der NMR-Daten.

Weiterhin danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Reinhard Krämer und seiner Arbeitsgruppe für die große Unterstützung ohne die ein Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Lothar Jaenicke, der mir in vielfacher Hinsicht ein großes Vorbild ist.

Bei meinen Laborkollegen und Mitarbeitern bedanke ich mich herzlich für die kollegiale Unterstützung und die gute Zusammenarbeit. Insbesondere danke ich Frau Eva Glees und Frau Gabi Sitek für ihre außerordentliche Hilfsbereitschaft, die vielen wertvollen praktischen Hilfestellungen und das weit mehr als freundschaftliche Verhältnis der letzten Jahre.

Daneben danke ich meinen Freunden Markus Albertsen, Yesim Alpagut, Christian aus dem Spring, Michael Becker, Velat Deniz, Sabine Elwers, Claudia Hilsmann, Tina Kop-Weiershausen, Ralph Overath, Claudia Schulz, Knut Stippich, Dominik Stuhlmann, Diana Stuhlmann, Diana Wagner-Stippich, Tina Wahle, Julia Warnau und Anja Wittmann von ganzem Herzen für ihre Unterstützung und dafür, dass sie für mich da waren.

Mein größter Dank gilt aber meiner Familie, meiner lieben Mutter, meinem lieben Vater und meinen beiden Schwestern Luise und Beate, die immer zu mir gehalten und mich unterstützt haben und die insbesondere in der Endphase dieser Arbeit sehr mit mir gelitten haben.

## Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Frau Prof. Dr. S. Waffenschmidt betreut worden.

---

Klaus Bollig

### Teilpublikationen:

**K. Bollig, M. Lamshöft, K. Schweimer, F.J. Marner, D. Herebian, H. Budzikiewicz, S. Waffenschmidt**

*Structural analysis of linear hydroxyproline-bound glycans of Chlamydomonas reinhardtii – the inner core is conserved in Chlamydomonas and higher plants.*

2006, eingereicht.

**S. Kilz, K. Bollig, H. Budzikiewicz, S. Waffenschmidt**

*Structure of linear and branched heteroarabinosides linked to hydroxyproline in Chlamydomonas reinhardtii –implications for their biosynthesis.*

2006, eingereicht.

### Posterpräsentationen:

**K. Bollig, S. Waffenschmidt**

*Structural analysis of linear hydroxyproline-bound glycosides in Chlamydomonas reinhardtii.*

11<sup>th</sup> International Conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas* (Kobe / Japan 2004)

**S. Waffenschmidt, K. Bollig, J. Warnau**

*O-Glycosylation in Chlamydomonas –what the genome can't tell us.*

12<sup>th</sup> International Conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas* (Portland / USA 2006)

**K. Bollig, S. Waffenschmidt**

*Structural analysis of hydroxyproline-bound glycans in Chlamydomonas reinhardtii.*

17<sup>th</sup> International Botanical Congress (Wien / Österreich 2005)

## Lebenslauf

Name: Bollig

Vorname: Klaus

Geburtsdatum: 21. Oktober 1972

Geburtsort: Trier

Wohnung: Vorgebirgsblick 39  
53844 Troisdorf

Eltern: Reimund Bollig  
Ursula Bollig, geb. Beidinger

Schul Ausbildung: 1979-1983 städt. Grundschule Troisdorf  
1983-1992 städt. Gymnasium Troisdorf-Sieglar

Schulabschluß: Abitur

weiterer Werdegang: 1992-1993 Sanitätsausbildung im Rahmen des Wehrdienstes

1993-1994 Chemiestudium an der Universität zu Köln

1994-2001 Biologiestudium an der Universität zu Köln mit dem  
Abschluss Diplombiologe

seit 2002 Promotion im Fachbereich Biochemie der Universität  
zu Köln